KLONIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES HÄMOCYANIN-GENS DER VOGELSPINNE EURYPELMA CALIFORNICUM

Wolfgang Voll

Disbui. München
1989

LIBRARY

KLONIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG EINES HÄMOCYANIN-GENS DER VOGELSPINNE EURYPELMA CALIFORNICUM

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Fakultät für Biologie

der

Ludwig - Maximilians - Universität

München

vorgelegt von Wolfgang Voll

aus München

Januar 1989

1. Gutachter: Priv. Doz. Dr. Walter Schartau

2. Gutachter: Prof. Dr. Charles N. David

Tag der mündlichen Prüfung: 22.3.1989

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK GmbH
8000 München 2, Gabelsbergerstr. 15, Tel. 288663

Meinen Eltern

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit wurde am Zoologischen Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen durchgeführt.

Er hat durch die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sein stetes Interesse an der Arbeit und durch anregende Diskussionen, vor allem in der Endphase der praktischen Arbeit viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Nach seinem plötzlichen Tod übernahm die Betreuung dieser Arbeit Herr Priv. Doz. Dr. Walter Schartau. Bei ihm bedanke ich mich für seine ständige Bereitschaft, die schriftliche Fixierung dieser Arbeit durch zahlreiche Diskussionen zu erleichtern.

Herrn Priv. Doz. Dr. Hans-Jürgen Schneider danke ich für die Themenstellung der Arbeit.

Weiterhin bedanke ich mich recht herzlich für die wichtige Hilfe bei der Computerauswertung der zahlreichen Sequenzdaten bei Herrn Dr. Michael Duchêne (Genzentrum München). Für die Synthese der Oligonukleotidproben möchte ich mich bei Herrn Dr. Thomas Dörper (Abt. Prof. Winnacker) und bei Herrn Dr. Ronald Mertz und Frau Dorit Weigand (Genzentrum München) bedanken.

Frau Dr. Susanne Modrow schulde ich meinen Dank für die Hilfe bei den Voraussagen zur Sekundärstruktur und weiterer Eigenschaften des Hämocyanins.

Herzlich danke ich allen Mitarbeitern der Abteilung für die angenehme und freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. Unter ihnen möchte ich besonders Frau Dr. Renate Voit und Frau Gertraud Feldmaier-Fuchs für ihre stete Diskussionsbereitschaft und anregende Zusammenarbeit erwähnen. Schließlich danke ich Herrn Dr. Thomas Leidescher für die großzügige Überlassung seines Computers zur schriftlichen Niederlegung dieser Arbeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554827_0047

INHALTSVERZEICHNIS

A EINLEITUNG 1

B MATERIAL UND METHODEN 5

I Materialien

1 Chemikalien 5
2 Materialien für die Molekularbiologie 5
3 Radioaktive Substanzen 7
4 Geräte 8
5 Bakterienstämme, Phagen, Plasmide 8
6 Medien für die Bakterien- und Phagenkulturen 10
7 Häufig verwendete Puffer und Medien 14

II Methoden

1 Tiere und Tierhaltung 15

2 Ständig verwendete Routinemethoden 15
2.1 Sterilisation 15
2.2 DNA-Bestimmung und UV-Spektren 15
2.3 Extraktion mit Phenol und Chloroform 16
2.4 Präzipitation von Nukleinsäuren durch Ethanol 16

3 Isolierung genomischer DNA aus Frischgewebe 16

4 Arbeiten mit dem Phagen λ 18
4.1 Präparation von Bakterien zur Infektion mit λ-Phagen 18
4.2 Titerbestimmung von Phagensuspensionen 18
4.3 Präparation von Phagenstammlösungen 19
4.4 Ausstechen eines einzelnen Plaques 19
4.5 Langfristiges Aufbewahren von Phagen 19
4.6 In vitro packaging von λ-DNA 20
4.6.1 "Sonicated Extract" (SE) 21
4.6.2 "Freeze-Thaw Lysate" (FTL) 22
4.6.3 "Packaging" der DNA 23
4.7 λ-DNA Isolierung (Großansatz) 23

5 Arbeiten mit Bakterien 26
5.1 Isolierung einzelner Kolonien 26
5.2 Übernachtkulturen (ÜNK) 26
5.3 Langfristiges Aufbewahren von Bakterien 26

6 Etablieren einer Genbank (Klonieren in den Phagen λ-EMBL3) 27
6.1 Vorbereiten des Vektors 28
6.2 Vorbereiten der DNA-Fragmente 29
6.3 Ligierung und "Packaging" der DNA 31
6.4 Amplifikation der Genbanken 31

7	Restriktionsspaltungen, DNA-Gele	32
7.1	Restriktionsspaltungen der DNA	32
7.2	Auftrennung der DNA-Fragmente durch Agarose-gelelektrophorese	33
7.3	Alkalische Agarosegelelektrophorese	34
8	Radioaktive Markierung der DNA	34
8.1	Nick-Translation	34
8.2	Markierung über Random-Hexamer-Priming nach FEINBERG and VOGELSTEIN (1983, 1984)	35
8.3	Endmarkierung von synthetischen Oligonukleotiden	36
9	Markierung von DNA mit biotinylierten Nukleotiden	37
10	Screening von genomischen Genbanken	38
10.1	Plaquefixierung und Nitrozellulosefilterabzüge	38
10.2	Plaquehybridisierung mit nick-translatierter DNA als Hybridisierungsprobe	39
10.3	Reinigung positiver Klone	40
10.4	Schnellaufschluß der Phagen	41
11	Analyse rekombinanter Klone	42
11.1	Kombinierte Restriktionsenzymspaltung	42
11.2	"Southern-Transfer" von DNA auf Nitrozellulose	42
11.3	Hybridisierung mit ^{32}P-nick-translatierter Proben-DNA	43
11.4	Hybridisierung mit ^{32}P-endmarkierten Oligonukleotiden	43
11.5	Hybridisierung mit bio-11-dUTP markierten DNA-Fragmenten	45
12	Subklonieren in Plasmide	48
12.1	Kompetenzinduktion von E. coli DH1/DH5α-Zellen	48
12.2	Vorbereiten des Vektors und Dephosphorylierung	49
12.3	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	50
12.4	Ligierung und Transformation	50
13	Isolierung von Plasmid-DNA	51
13.1	Minilyse	51
13.2	Großansatz	53
14	Konstruktion von Deletionsmutanten mit Exonuklease III/VII	54
15	Subklonierung in M13-Phagen	55
15.1	Subklonierung und Transformation	55
15.2	Präparation von einzelsträngiger M13-Phagen-DNA	55
16	DNA-Sequenzierungsmethoden	56
16.1	Sequenzierung in M13-Vektoren nach der Dideoxymethode	56
16.2	Plasmid-Sequenzierung nach der Dideoxymethode	56
16.2.1	Sequenzierungsreaktionen	57
16.2.2	Plasmid-Sequenzierung mit T7-DNA-Polymerase (Sequenase™) nach der Dideoxymethode	57
16.3	Sequenzgele	59

C ERGEBNISSE 60

I Etablierung genomischer Genbanken in λ-EMBL3 60

II Screening der Genbank Eury IV mit dem pHC4e-Klon 63

1 Physikalische Kartierung der Klone Hc 1 bis Hc 15 64
2 Hybridisierung der Hc-Klone Hc 1-Hc 15 mit "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe 74

III Unterklonierung und Sequenzierung der mit dem pHC4e-Klon hybridisierenden Bereiche 76

1 Charakterisierung des Klons Hc 10 76
1.1 Charakterisierung des UK Hc 10S4,1 76
1.2 Charakterisierung des UK Hc 10X/S3,2 79
1.3 Charakterisierung des UK Hc 10S0,4 82

2 Charakterisierung des Klons Hc 15 82
2.1 Charakterisierung des UK Hc 15H1,1 83
2.2 Charakterisierung des UK Hc 15H2,7 85

3 Charakterisierung des Unterklons Hc 12S3,7 87

4 Charakterisierung des Unterklons Hc 4H2,2 91

5 Charakterisierung des Klons Hc 6 93
5.1 Charakterisierung der Unterklone Hc 6E/S0,6 und Hc 6S0,6 94
5.2 Charakterisierung des Unterklons Hc 6E4,7 97

IV Isolierung des für die Hc UEe ersten codierenden Exons mit anschließender 5'-untranslatierter Region 100

V Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Klonierung und Charakterisierung eines Gens für die Hc UEe der Vogelspinne E. californicum 105

C DISKUSSION 116

I Klonierungsstrategie 116

II Screeningstrategie 117

III Vergleich der Exonsequenzen mit cDNA- und Proteinsequenzen der UEe von Eurypelma californicum 119

IV Charakteristika der für die Hc UEe der Vogelspinne E. californicum codierenden DNA-Sequenzen 123

1 Genomorganisation 123
2 Exon-Intron Grenzen und einige besondere Charakteristika der Introns 124
3 GC-Gehalt und Codonauswahl 127

4 Das 5'-Ende des Gens für die Hc UEe der Vogelspinne E. californicum 131
5 Die 3'-untranslatierte Region des Gens für die Hc UEe der Vogelspinne E. californicum 134
6 Vergleich der Exons mit der postulierten Domänenstruktur der Hc UEe der Vogelspinne E. californicum 136

V Anmerkungen zur Evolution der Hämocyanine 144

E ZUSAMMENFASSUNG 149

F ANHANG 151

I Tabellarische Darstellung der Restriktionsfragmente der Klone Hc 1-15 151
II Restriktionskarten der am meisten verwendeten Vektoren 154

G LITERATUR 156

ABKÜRZUNGEN

Aminosäuren

A	Alanin	M	Methionin
C	Cystein	N	Asparagin
D	Asparaginsäure	P	Prolin
E	Glutaminsäure	Q	Glutamin
G	Glycin	R	Arginin
H	Histidin	S	Serin
I	Isoleucin	T	Threonin
K	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

Restriktionsendonukleasen

B	Bam HI	P	Pst I
B°	Bgl II	S	Sal I
E	Eco RI	S°	Sau 3AI
H	Hind III	X	Xba I
H°	Hinc II	X°	Xho I

amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
B	Base
Bp	Basenpaar
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
cos-sites	cohesive sites
cpm	Zählimpulse pro Minute
D	Dalton
dA (C,G,T) Tp	Deoxyadenosin (-cytidin,-guanosin,-thymidin)-5'-Triphosphat
ddA (C,G,T) Tp	Dideoxyadenosin (-cytidin,-guanosin,-thymidin)-5'-Triphosphat
dNTP	Deoxynukleotid-5'-Triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Hc	Hämocyanin
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthiogalactosid
kBp	kilo Basenpaare
kD	kilo Dalton
M	Molarität

x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
MET	2-Mercaptoethanol
min	Minute
mRNA	messenger RNA
NTA	Nitrilotriacetat
OD	Optische Dichte
PEG	Polyethylenglykol
pfu	plaque forming unit
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulphat
sec	Sekunde
ss	einzelsträngig
tet	Tetracyclin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	Cethylphenoxypolyethoxyethanol
tRNA	transfer RNA
U	Enzymeinheiten
UE	Untereinheit
ÜNK	Übernachtkultur
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactosid

A EINLEITUNG

Im Organismus können Proteine strukturelle (Gerüstproteine) oder funktionelle (Enzyme) Bausteine darstellen. In den Reaktionszentren vieler Proteine, die entweder am Transport von molekularem Sauerstoff oder an Redoxreaktionen beteiligt sind, spielt Kupfer oder Eisen als Cofaktor eine entscheidende Rolle. Im Gegensatz zu den Hämoglobinen und Chlorocruorinen, bei denen das Eisenatom im Reaktionszentrum an einen Protoporphyrinring gebunden ist, liegt Eisen beim Hämerythrin und Kupfer beim Hämocyanin direkt an der Peptidkette gebunden vor.

Bis heute kennen wir Proteine mit einem oder zwei Kupferatomen pro Reaktionszentrum. Zu der Gruppe mit mononuklearem Kupferkomplex werden Plastocyanin, Azurin, Superoxiddismutase und Cytochromoxidase gezählt, während Tyrosinase, Ceruloplasmin, Arylphorin, Laccase, Ascorbatoxidase sowie Hämocyanin jeweils zwei Kupferatome in ihren aktiven Zentren besitzen.

Hämocyanine kommen ausschließlich bei Vertretern zweier Stämme des Tierreichs vor, den Mollusken und den Arthropoden. Innerhalb des Molluskenstammes findet man sie in den Klassen der Amphineura, Placophora, Gastropoda, Cephalopoda und der Bivalvia (MORSE et al., 1986), im Stamm der Arthropoda bei den Merostomata, Crustacea, Arachnida und Myriapoda (Review: ELLERTON et al., 1983).

Allen Hämocyaninen ist gemeinsam, daß sie frei in der Hämolymphe gelöst sind, molekularen Sauerstoff transportieren und im oxygenierten Zustand eine bläuliche Farbe annehmen. Sie bilden hochmolekulare, im Elektronenmikroskop darstellbare Aggregate, deren Quartärstruktur sehr gut untersucht ist. Das Molluskenhämocyanin bildet eine zylinderförmige Struktur aus bis zu 20 kettenartigen Einheiten von je 400 kD, die wiederum aus je 8 funktionellen , d.h. Sauerstoff-bindenden Domänen, bestehen. Im Gegensatz dazu besitzen die Arthropoden Aggregate aus heterogenen Monomeren von 68-76 kD, die in vivo zu Hexameren als kleinste Einheit aggregieren.

Der Aggregationszustand der Arthropodenhämocyanine ist artspezifisch: bei Crustaceen können diese Hexamere entweder nativ vorkommen (1 x 6 Hc bei Bathynomus giganteus) oder ein Aggregat aus zwei Hexameren bilden (2 x 6 Hc bei Cancer pagurus und Astacus leptodactylus). Im Unterstamm der Cheliceraten wurden noch komplexere Aggregate gefunden: 4 x 6mere bei Eurypelma californicum und Androctonus australis, sowie 8 x 6mere bei Limulus polyphemus und Tachypleus tridentatus (s. als Review: MARKL, 1986).

Schon frühzeitig konnte durch die Arbeitsgruppe Linzen, die überwiegend mit dem Hc der Vogelspinne E. californicum arbeitet, ausgeschlossen werden, daß die Heterogenität der monomeren UE durch posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung, Übertragung von Zuckerresten oder Abspaltung aminoterminaler sowie carboxyterminaler Peptide entsteht (SCHNEIDER et al., 1977; MARKL et al., 1979; KELLERMANN, 1982). Sieben verschiedene UE (a bis g), die im Verhältnis

4:2:2:4:4:4:4

stehen (MARKL et al., 1981) bilden ein 24mer aus 4 Hexameren. Mit proteinchemische Methoden konnten die Aminosäuresequenzen der Untereinheiten a (SCHARTAU, pers. Mit.), d (SCHARTAU et al., 1983) und e (SCHNEIDER et al., 1983) vollständig, diejenige der Untereinheit b nahezu vollständig (SONNER, pers. Mit.) sowie diejenigen der Untereinheiten c, f, und g ansatzweise aufgeklärt werden. Mit der Sequenzierung entsprechender cDNA-Klone (UEe: VOIT, 1987; UEa: VOIT, pers. Mit.; UEb: SONNER: pers. Mit.) wurde zur Primärstrukturaufklärung der UE neuerdings auch auf molekulargenetische Arbeitsmethoden zurückgegriffen.

Zwar kann die Phylogenie einzelner Hc-UE im Stamm der Arthropoden als gut geklärt betrachtet werden (MARKL, 1986), doch ist die Beantwortung der Frage nach dem Ursprung aller Hämocyanine noch relativ umstritten. Auf Grund wichtiger Unterschiede (z.B. Quartärstruktur, Größe und Struktur von funktionellen Untereinheiten) der Mollusken und Arthropoden Hämocyanin-Typen könnte man auf eine konvergente Entwicklung der Hämocyanine nach Trennung beider Tierstämme schließen. Doch schon Arbeiten von GHIRETTI et al. (1975, 1977) brachten Hinweise auf einen monophyletischen Ursprung der Hämocyanine: Die Ergebnisse der Vergleiche von Aminosäurezusammensetzungen verschiedenster Hämocyanine offenbarten

große Sequenzhomologien (60 ± 10 %). Keinen eindeutigen Verwandtschaftsnachweis der beiden Hc-Typen lieferten immumologische Untersuchungen, die, auf der Suche nach gemeinsamen antigenen Determinanten, nur sehr schwache Kreuzrektionen der Hämocyanine beider Stämme fanden (LAMY et al., 1983). In einen möglichen Zusammenhang mit der Entwicklung der Hämocyanine brachten HIMMELWRIGHT et al. (1980) die Tyrosinasen, die spektroskopische Ähnlichkeiten mit den Hämocyaninen aufweisen. Neuere Arbeiten (LERCH et al., 1986; DREXEL et al., 1987) zeigten, daß diese - ebenfalls binuklearen - Kupferproteine bestimmte Sequenzen, nämlich die des "Kupfer B"-Bindungszentrums, mit allen anderen Hämocyaninen gemeinsam haben. So kann durchaus auf ein gemeinsames Kupfer-haltiges Vorläuferprotein geschlossen werden, von dem sich nach Trennung der Stämme der Arthropoden und Mollusken die heute so unterschiedlichen Architekturen der Hämocyanine entwikkelt haben.

Eine holländische Arbeitsgruppe konnte als erste die dreidimensionale Struktur einer Hc-UE durch Röntgenstrukturanalyse der deoxygenierten UEa der Languste Panulirus interruptus entschlüsseln (GAYKEMA et al., 1984): Die Architektur einer UE kann in drei Domänen gegliedert werden, deren mittlere an Aufbau des aktiven Zentrums ("Kupfer A" und "Kupfer B") beteiligt ist. Am Strukturmodell des Hämoglobins konnte gezeigt werden, daß die Unterteilung der Peptidkette in strukturelle und funktionelle Domänen ein Abbild auf genetischer Ebene findet (GO, 1981). Drei Exons, getrennt durch zwei Introns, charakterisieren eine Transkriptionseinheit. Das mittlere Exon allein codiert für die Aminosäuren der zwei mittleren Domänen, die in der Lage sind, die Häm-Gruppe spezifisch zu binden, währen das erste und das dritte Exon der ersten und der vierten Domäne entsprechen. Ein drittes Intron, das das mittlere Exon genau an der Grenze zwischen den zwei mittleren Domänen unterteilt, wurde - wie von GO (1981) vermutet - bei einem Leguminosen-Hämoglobin gefunden (JENSEN et al., 1981). Neuere Arbeiten entdeckten sogar ein Gen ohne Introns bei Chironomus thummi (ANTOINE and NISSING, 1984) als auch ein durch drei Exons charakterisiertes Hämoglobin-Gen bei dem Invertebraten Lumbricus terrestris (JHIANG et al., 1988).

Vor Beginn dieser Arbeit waren weder Daten über Hämocyanin-Gene noch über Gene der Tyrosinasen verfügbar. Sollte nämlich eine gemeinsame Wurzel beider Kupferproteine bestehen, würde man nach Anwendung des "exon shuffling"-Modells (GILBERT, 1978; BLAKE, 1978) für Hämocyanine und Tyrosinasen gemeinsame Exons erwarten. An Hand der Blutserinproteasen konnte sehr gut gezeigt werden, wie eine Proteinfamilie gemeinsame Domänen besitzt, die durch wohl definierte Exons codiert werden (PATTHY, 1985).

In dieser Arbeit soll zum erstenmal ein Hc-Gen kloniert und charakterisiert werden, um unter anderem die Korrelation eventueller Exons mit der Domänenstruktur der Polypeptidkette als auch die Anwendbarkeit des "exon shuffling"-Modells auf die Evolution der binuklearen Kupferproteine zu überprüfen. Die Suche nach den Strukturgenen des Hämocyanins wurde entscheidend durch eine Arbeit von VOIT and SCHNEIDER (1986) erleichtert: Aufbauend auf der Entdeckung von KEMPTER (1983), daß Hämocyten in der Herzinnenwand der Vogelspinne Hc produzieren, gelang es nach Isolierung der mRNA aus Herzgewebe (VOIT, 1984) cDNA-Genbanken anzulegen und einen für die Hc UEe codierenden Klon zu "fischen" (VOIT and SCHNEIDER, 1986). Da dieser Klon für rund 87 % der UEe codiert, stellt er eine ausgezeichnete Sonde zur Suche nach einem möglichst vollständigen Gen dar.

Folgende Strategie wurde im Rahmen meiner Arbeit angewendet, um die ersten Grundlagen zur Beantwortung der Fragen nach der Struktur eines Hc-Gens, nach der Biosynthese eines so komplexen Aggregates, sowie nach der Evolution der Hämocyanine auf molekulargenetischer Ebene zu legen:

1. Etablierung einer möglichst umfangreichen genomischen Genbank.
2. Screening der Genbank mit spezifischen Sonden:
   z.B. synthetische Oligonukleotidprobe, abgeleitet aus der hochkonservierten Aminosäuresequenz -H-H-W-H-W-H- (SCHNEIDER et al., 1982) und cDNA-Klon der Hc UEe.
3. Charakterisierung positiver Klone durch Restriktionsenzymspaltung und Hybridisierung mit den oben erwähnten Sonden.
4. Unterklonierung und Sequenzierung der mit den Sonden hybridisierenden Bereiche (Exonsequenzen mit angrenzenden Introns).
5. Charakterisierung der 5'- und 3'-untranslatierten Regionen.

B MATERIAL UND METHODEN

I Materialien

I.1 Chemikalien

Die Laborchemikalien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen MERCK/Darmstadt, SIGMA/Taufkirchen bei München und FLUKA/Buchs, Schweiz, bezogen und waren von p.A. Qualität:

Cäsiumchlorid	BRL/Eggenstein
Sephadex G-50 fine DNA-Grade	PHARMACIA/Freiburg
Acrylamid (2 x kristallisiert)	SERVA/Heidelberg
Bromphenolblau	
DEAE-52 Cellulose	
Harnstoff	
PEG 6000	
SDS	
Xylencyanol	

I.2 Materialien für die Molekularbiologie

Szintillator Ready Solve EP	BECKMAN/München
IPTG	BIOMOL/Ilvesheim
X-Gal	
Ionenaustauscher AG501-X08	BIORAD/München

Alkalische Phosphatase (CIP) DNA-Polymerase I (Kornberg-Polymerase) DNA-Polymerase I (Klenow Fragment) T4-DNA-Ligase	BOEHRINGER/Mannheim
Agarose Biotin-11-dUTP Exonuklease III und VII Lambda-DNA Restriktionsenzyme T4-DNA-Ligase	BRL/Eggenstein
Detek I-alk Signal Generating System	ENZO BIOCHEM, über ORTHO DIAGNOSTIC SYSTEMS GmbH/ Neckargmünd
Agar Baktotrypton Hefeextrakt	GIBCO/Eggenstein
X-OMAT AR Filme Intensifier Screens	KODAK/Rochester,N.Y., USA
Nitrozellulosefilter (HATF)	MILLIPORE/Eschborn
Glaskapillaren (Ø 0,1 mm)	MÜLLER/Berlin
M13 Universal Sequencing Primer M13 Reverse Sequencing Primer	NEW ENGLAND BIOLABS/Schwalbach bei Frankfurt

Deoxynukleotide	PHARMACIA/Freiburg
Dideoxynukleotide	
DNA-Polymerase I (Klenow Fragment, kloniert)	
Hexamere $pd(N)_6$	
T4-DNA-Polynukleotidkinase	
DEAE Membran (NA45)	SCHLEICHER & SCHÜLL/Dassel
Nitrozellulosefilter (BA85)	
Sterile Membranfilter (Ø 0,45 µm)	
Ampicillin	SIGMA/Taufkirchen bei München
"Bind Silan" [γ-(Methacryloxy)-propyltrimethoxysilan]	
Deoxyribonuklease I	
Ficoll 400	
Lachsspermien-DNA	
Polyvinylpyrrolidon 360	
Proteinase K	
Ribonuklease A	
Rinderserumalbumin	
Tetracyclin	
WHATMAN 3MM Papier	VETTER/Wiesloch

I.3 Radioaktive Substanzen

α-^{32}P-dATP (3000 Ci/mM)	AMERSHAM/Braunschweig
α-^{32}P-dCTP (3000 Ci/mM)	
γ-^{32}P-ATP (3000 Ci/mM)	
α-^{35}S-dATP (400 Ci/mM)	

I.4 Geräte

Transilluminator (302 nm), Vilber Lourmat	Bachofer/Reutlingen
Makromould DNA Sequenzierapparatur und Zubehör	LKB/München
Elektrophoresekammern GNA-100, GNA-200	Pharmacia/Freiburg

I.5 Bakterienstämme, Phagen und Plasmide

BHB2688	(N205recA$^-$[λimm^{434}, cIts, b2, red$^-$, Eam, Sam]/λ) (HOHN and MURRAY, 1977; HOHN, 1979). Geschenk der AG Prof. Winnacker/Biochem. Inst., München.
BHB2690	(N205recA$^-$[λimm^{434}, cIts, b2, red$^-$, Dam, Sam]/λ) (HOHN and MURRAY, 1977; HOHN, 1979). Geschenk der AG Prof. Winnacker/Biochem. Inst., München.
DH1	F$^-$,endA1, hsdR17(rk$^-$, mk$^+$), supE44. thi-1, λ$^-$, recA1, gyrA96, relA1 (HANAHAN, 1983); Geschenk der AG Prof. Winnacker/Biochem. Inst., München.
DH5α	Genotyp wie DH1, zusätzlich: ø 80dlacZ M (BRL, 1986); Bezugsquelle: BRL/Eggenstein.

JM109	recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17, supE44, relA1, λ^-, (lac-proAB), [F',traD36, proAB, lacI^{q}Z M15] (YANISCH-PERRON et al., 1985); Geschenk der AG Prof. Winnacker/Biochem. Inst., München.
K803	Genotyp ähnlich K802: hsdR$^+$, hsdM$^+$, gal$^-$, supE (WOOD, 1966); Geschenk der AG Prof. Winnacker/Biochem. Inst., München.
Q358	hsdR$_k$, hsdM$_k$, supF, ϕ80^r (Karn et al., 1980); Geschenk der AG Dr. Domdey, Genzentrum München.
Q359	hsdR$_k$, hsdM$_k$, supF, ϕ80, P2 (Karn et al., 1980); Geschenk der AG Dr. Domdey, Genzentrum München.
λ-EMBL3	λsbhIλ1°, b189, <polylinker (Sal I-Bam HI-Eco RI), int29, ninL44, cI857, trpE, polylinker (Eco RI-Bam HI-Sal I)>, KH54, chiC, srIλ4°, nin5, srIλ5° (FRISCHAUF et al., 1983). Geschenk der AG Dr. Domdey, Genzentrum München.
M13mp8/9/10/11	(MESSING and VIEIRA, 1982; Messing, 1983); Bezugsquelle: AMERSHAM/Braunschweig.
pBR322	(Bolivar et al., 1977); Bezugsquelle: BRL/Eggenstein.

pUC8, pUC9	(VIEIRA and MESSING, 1982); Geschenk der AG Dr. Moritz/Zoolog. Inst. und Prof. Winnacker/Biochem. Inst., München.
pUC18, pUC19	(YANISCH-PERRON et al., 1985); Geschenk der AG Dr. Domdey, Genzentrum, München.

I.6 Medien für die Bakterien- und Phagenkulturen

Stammlösungen für Selektionsmarker

Ampicillin (Na-Salz)	: 25 mg/ml in H_2O
Tetracyclin-Hydrochlorid	: 12,5 mg/ml in 20 % (v/v) Ethanol
X-Gal	: 2 % (w/v) in Dimethylformamid
IPTG	: 0,1 M in H_2O

Die fertigen Lösungen wurden jeweils steril filtriert.

Beschallungspuffer

EDTA	1 mM
β-Mercaptoethanol	5 mM
$MgCl_2$	3 mM
Tris/HCl, pH 8,0	20 mM

BBL-Platten

Tryptic Soy Broth	10 g
NaCl	5 g
Bactoagar	10 g
	H_2O ad 1 l

DH1-Medium

Baktotrypton	20 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H_2O	ad 1 l

Mit 1 M KOH pH-Wert auf 7,6 einstellen.

DH1-Platten

DH1-Medium mit 15 g Agar/l.

DH1 amp-Platten

DH1-Platten mit 50 µg Ampicillin/ml.

DH1 tet-Platten

DH1-Platten mit 12,5 µg Tetracyclin/ml.

DH1 amp/XGal-Platten

DH1-Platten, die zusätzlich 0,004 % X-Gal, sowie 0,1 mM IPTG enthalten.

Glucose Minimalmedium

M9 Salze:	Na_2HPO_4	6 g
	KH_2PO_4	3 g
	NH_4Cl	1 g
	NaCl	0,5 g
	H_2O	ad 500 ml
$MgSO_4$ x 7 H_2O (1 M)		1 ml
$CaCl_2$ (0,1 M)		10 ml
Thiamin-HCl (HCl)		1 ml
GLucose (20 %)		10 ml

Die jeweiligen Salzlösungen wurden getrennt autoklaviert, Vitamin B_1 und Glucose steril filtriert und sodann vereint.

H_2O	ad 1 l

Glucose Minimalmedium-Platten

Glucose Minimalmedium mit 15 g Agar/l.

H-Platten

Baktotrypton	10 g
NaCl	8 g
Agar	15 g
H_2O	ad 1 l

H-Top Agar

Baktotrypton	10 g
NaCl	8 g
Agar	6 g
H_2O	ad 1 l

LB-Medium

Trypton	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
H_2O ad	1 l

NZ-Medium

N-Z Amin	10 g
NaCl	5 g
$MgCl_2$	2 g
H_2O ad	1 l

NZCYM-Medium

N-Z Amin	10 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
$MgSO_4$ x 7 H_2O	2 g
H_2O ad	1 l

SM-Lösung

NaCl	5,8 g
$MgSO_4$ x 7 H_2O	2 g
Gelatine	1 g
1 M Tris/HCl (pH 7,5)	50 ml
H_2O ad	1 l

Top-Agarose

Agarose	0,5 %
$MgSO_4$	10 mM

2 x TY-Medium

Baktotrypton	16 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g
H_2O	ad 1 l.

I.7 Häufig verwendete Puffer und Lösungen

TE-Puffer	: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0.
0,2 M EDTA, pH 8,0	: EDTA (Na_2)-Salz, mit NaOH ad pH 8,0.
10 x PBS	: 1,3 M NaCl; 0,07 M Na_2HPO_4; 0,03 M NaH_2PO_4.
20 x SSC	: 0,3 M Natriumcitrat, 3 M NaCl.
50 x Denhardt's Lösung	: 5 g Ficoll 400 5 g Polyvinylpyrrolidon 360 5 g BSA H_2O ad 500 ml
Lysozym-Stammlösung	: 25 mg Lysozym/ml in H_2O
RNase-Stammlösung	: 10 mg /ml RNase A in 10 ml Tris/HCl, pH 7,5, 15 mM NaCl; zur Entfernung von DNase-Aktivität erhitzt und abgekühlt nach MANIATIS et al. (1982).
Lachs-DNA-Stammlösung	: 10 mg/ml in H_2O; durch Ultraschallbehandlung zerkleinert und anschließend hitzedenaturiert (MANIATIS et al., 1982).

II Methoden

II.1 Tiere und Tierhaltung

Das Versuchstier, die Vogelspinne Eurypelma californicum, ist im Süden und Südwesten der USA beheimatet und wurde von CAROLINA BIOLOGICAL SUPPLY COMPANY (BURLINGTON/N.C.) bezogen. Die Tiere wurden unter Bedingungen, die bereits LOEWE and LINZEN (1973) beschrieben hatten, gehalten.

II.2 Ständig verwendete Routinemethoden

II.2.1 Sterilisation

Alle Glaswaren, Plastikgefäße und Lösungen wurden durch 20-30minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert. Nicht autoklavierbare Lösungen wurden durch Sterilmembranfilter der Porengröße 0.45 µm filtriert.

II.2.2 DNA-Bestimmung und UV-Spektren

Der DNA-Gehalt einer Lösung wurde durch Messen der Absorption bei 260 nm ermittelt. Für dsDNA wurde ein Extinktionswert von 1 gleich 50 µg/ml DNA gesetzt (MANIATIS et al., 1982). Zur Reinheitsüberprüfung isolierter DNA wurden mit einem Spektralphotometer (Modell CARY 118 der Firma VARIAN) Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich zwischen 220 und 320 nm automatisch aufgezeichnet. Bei reiner DNA ist der Quotient der Absorptionswerte 260 nm/280 nm größer als 1,8.

II.2.3 Extraktion mit Phenol und Chloroform

Kristallines Phenol wurde geschmolzen, mit 1 M Tris/HCl, pH 8,0, ausgeschüttelt und unter diesem Puffer aufbewahrt. Bei Bedarf wurde die Phenollösung mit TE-Puffer äquilibriert. Chloroform war stets mit 4 % Isoamylalkohol versetzt.

Im allgemeinen, wenn nicht anders vermerkt, wurden DNA-Lösungen mit dem gleichen Volumenanteil Phenol extrahiert, die Phasen durch Zentrifugation getrennt, und die wäßrige Phase einmal mit Phenol/Chloroform (1:1; v/v) und einmal mit Chloroform allein reextrahiert.

II.2.4 Präzipitation von Nukleinsäuren durch Ethanol

Nukleinsäuren in wäßrigen Lösungen wurden durch Zugabe von 0.1 Volumenteilen 3 M Natriumacetat, pH 4,8-5,2, und 2-2,5 Volumenteilen Ethanol (abs.) gefällt. Stark verdünnte DNA-Lösungen wurden zuvor mit n-Butanol konzentriert (MANIATIS et al., 1982). Zur Präzipitation wurde im Regelfall bei -20°C oder -70°C 30 min inkubiert und der Nukleinsäureniederschlag bei 12000 x g abzentrifugiert. Mit 70 %igem Ethanol wurden einmal die Präzipitate gewaschen und anschließend in einer Vakuumzentrifuge ("SPEED-VAC") getrocknet.

II.3 Isolierung genomischer DNA aus Frischgewebe

Hochmolekulare genomische DNA zur Etablierung von Genbanken in Phagensysteme wie λ-EMBL wurde im Folgenden nach Modifikationen der Anleitungen von BLIN and STAFFORD (1976), KIRBY (1968), MANIATIS et al. (1982) und HARTL (1983) erhalten: Eine Spinne wurde durch schrittweises Abkühlen (zuerst eine Stunde bei +6°C, dann 30 min. bei -20°C) auf ca. 0°C betäubt und dann aus dem Hinterleib Herz, Ovar und Lungengewebe entnommen. Nach mehrmaligem, gründlichen Waschen wurde das Gewebe gewogen und anschlies-

send auf einer sterilen Petrischale ausgebreitet, mit flüssigem Stickstoff übergossen und mit einer sterilen Rasierklinge möglichst klein geschnitten.

Der Gewebebrei wurde in ein steriles 10 ml Röhrchen überführt und einem dreistündigen Proteinverdau in Lysepuffer (7,5 ml PBS; 750 µl 0,4 M EDTA, pH 8.0; 400 µl SDS; 200 µl 35 % Sarcosyl; 300 µl Proteinase K, 10 mg/ml) unterzogen. Während dieser Zeit konnte beobachtet werden, wie die Lösung immer viskoser wurde. Daraufhin wurde ein Volumenteil Phenol zugesetzt und vorsichtig das Reaktionsröhrchen bewegt, um langsam das Phenol mit der wäßrigen Phase in Berührung zu bringen. Dies hatte mit äußerster Sorgfalt zu geschehen, um ein Scheren hochmolekularer DNA zu vermeiden. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 2500 rpm wurde langsam mit einer sterilen Pasteurpipette die hochviskose wäßrige Phase abgezogen, zweimal mit Phenol/Chloroform (1:1; v/v) und abschließend einmal mit Chloroform ausgeschüttelt wie oben (s. B.II.2.3) beschrieben. Dann wurde 1/9 Vol. Natriumacetat (3,0 M, pH 4,8) zugegeben und sorgfältig vermischt. Sobald die DNA-Lösung mit dem gleichen Volumen Isopropanol überschichtet wurde, konnte man sehen, daß an der Phasengrenze die DNA auszufallen begann. Die DNA wurde anschließend durch vorsichtiges Rühren an der Phasengrenze auf eine gebogene und an der Spitze zugeschmolzene Pasteurpipette aufgewickelt. Dies geschah durch langsames Drehen, Heben und Senken der Pasteurpipette an der Phasengrenze, so daß nur dort die DNA präziptieren konnte. Anschließend wurde die DNA an der Luft leicht getrocknet, mit 2 ml 70 %igem Ethanol gewaschen, erneut getrocknet und durch Drehen der Pipette in 500 µl TE gelöst. Die Länge und Unversehrtheit der DNA wurde in einem 0,6 %igen Agarosegel mit λ-DNA als Marker bestimmt. Die Ausbeute an DNA lag bei 0,1 % des Frischgewebes.

II.4 Arbeiten mit dem Phagen λ

II.4.1 Präparation von Bakterien zur Infektion mit λ-Phagen

Mit einer Einzelkolonie eines geeigneten Bakterienstammes wurden 100 ml LB-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach Abzentrifugation der Bakterienkultur in einem Sorvall SS 34-Rotor (4°C, 4000 rpm, 20 min) wurde das Zellpellet in 40 ml SM resuspendiert und bei 4°C aufbewahrt. Die Haltbarkeit war für die jeweiligen Stämme unterschiedlich und betrug z.B. für den K 803 Stamm 2-3 Wochen. 1 ml einer solchen Suspension enthielt in der Regel 6-7 x 10^9 Zellen.

II.4.2 Titerbestimmung von Phagensuspensionen

In einer Reihenverdünnung wurden 10 µl einer Phagensuspension jeweils 10fach verdünnt und im abgeschätzten Bereich zwischen 10^1 und 10^4 Phagen zur Infektion verwendet.

Von jeder zu untersuchenden Verdünnungsreihe wurden 10 µl entnommen, zu 90 µl einer Infektionskultur (B.II.4.1) gegeben, schnell vermischt und 15-20 min bei 37°C zur Anheftung der Phagen an die Bakterien inkubiert. Die infizierten Bakterien wurden zu 3,5 ml Top-Agarose, die zuvor auf 55°C im Wasserbad temperiert worden war, dazugegeben, zügig gemischt und unter Vermeidung von Luftblasen auf vorgewärmte 85 mm BBL-Platten gegossen. Nach Erstarren der Top-Agarose wurden die Platten in umgekehrter Lage 14-16 h bei 37°C bebrütet.

II.4.3 Präparation von Phagenstammlösungen

90 µl einer Infektionskultur (B.II.4.1) wurden mit ca. 10^5 pfu einer Phagensuspension infiziert und auf einer 85 mm BBL-Platte ausplattiert. Nach 16stündiger Inkubation bei 37°C war i.a. der Bakterienrasen völlig lysiert. Nun wurde mit 4 ml SM überschichtet und die Platte bei 4°C 4-8 h zum Herausdiffundieren der Phagen aufbewahrt. Danach wurde die SM-Lösung mit einer Pasteurpipette abgezogen und die Platte mit 1 ml SM nachgespült. Die SM-Lösungen wurden vereinigt und mit 50 µl Chloroform (1 %; v/v) versetzt. Diese Stammlösungen wurden bei 4°C aufbewahrt und enthielten 10^{10}-10^{12} pfu/ml.

II.4.4 Ausstechen eines einzelnen Plaques

Ein einzelner, von anderen deutlich abgesetzter Plaque wurde mit darunterliegender Top-Agarose entweder mit einer abgeschnittenen 200 µl-Pipettenspitze oder mit Hilfe einer sterilen Platinimpföse ausgestochen, in 500 µl SM gegeben, stark geschüttelt und mindestens 6 h bei 4°C aufbewahrt, damit die Phagen herausdiffundieren konnten. Von 10 µl dieser Phagensuspension wurde der Titer bestimmt und eine Stocklösung angelegt. Je nach Größe des ausgestochenen Plaques erhielt man 10^5-10^7 pfu.

II.4.5 Langfristiges Aufbewahren von Phagen

Um über längere Zeiträume hinweg ein Abnehmen der Infektiosität bestimmter Phagensuspensionen zu vermeiden, wurden von diesen 930 µl entnommen, mit 70 µl DMSO versetzt, vorsichtig gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Gefrorene Phagensuspensionen wurden entweder im flüssigen Stickstoff belassen oder bei -80°C aufbewahrt. Genbank-Stammlösungen wurden ohne DMSO schockgefroren und zur Wiederverwendung vollständig aufgetaut.

II.4.6 In vitro packaging von λ-DNA

Die Einführung des in vitro packaging von Phagen-DNA - zuerst beschrieben von B. and T. HOHN (1974) - ermöglichte es, längere DNA-Fragmente im Bereich von 10-22 kBp effizient zu vermehren. Somit wurden Abkömmlinge des λ-Phagen (HOHN and MURRAY, 1977; STERNBERG et al., 1977; HOHN, 1979) zu vielseitigen und leicht handhabbaren Vektoren, um rekombinante DNA zu klonieren.

Mit diesen Verfahren entstehen, sofern in einem bestimmten Abstand, der aber in einem gewissen Rahmen variieren kann, die für die Verpackung wichtigen Erkennungssequenzen - die cos-sites - vorhanden sind, intakte Phagen, die sich in ihrer Infektiosität von wt-Phagen kaum unterscheiden. Wenn eine Verpackungsausbeute von 10^9 pfu/ µg λ-wt-Phagen erzielt wird, so bedeutet dies, daß einer von zwanzig λ-Molekülen letztendlich zu einer Plaquebildung führt (FRISCHAUF, 1987). Dieses Ergebnis kann man allerdings nur mit langen, konkatameren Molekülen, die über die cos-sites miteinander verbunden sind, erzielen. Zirkuläre Moleküle, die mindestens zwei cos-sites enthalten müssen, sind wesentlich geringer effizient (ROSENBERG, 1985).

In dieser Arbeit wurde nach einem Laborprotokoll von B. HOHN von August 1980 verfahren, das selbst eine Modifikation der ursprünglichen Anleitung ist (BECKER and GOLD, 1975) und einige Verbesserungen enthält. Für die Verpackung in vitro wurden die Lysate zweier verschiedener E. coli Stämme (BHB2690 und BHB2688) verwendet, die einen im Bakterienchromosom integrierten Phagen enthalten. Verschiedene amber-Mutationen im Phagengenom unterbrechen den Zusammenbau des Phagen an unterschiedlichen Stellen. Wenn man beide Extrakte mit rekombinanter λ-DNA vermischt, wird diese zu vitalen λ-Phagen verpackt, die dann E. coli-Zellen infizieren können. Die Präparation der beiden Lysate wird im folgenden beschrieben.

II.4.6.1 "Sonicated Extract" (SE)

Der SE wurde aus einem Lysat des E. coli-Stamms BHB2690 gewonnen. Vor Präparation des SE wurde die Verwendbarkeit des Stammes BHB2690 getestet. Dazu wurden von einer Glycerinkultur Ausstriche auf zwei LAM-Platten gemacht, von denen eine bei 32°C und die andere bei 42°C bebrütet wurde. Über Nacht durften nur auf der bei 32°C inkubierten Platte Kolonien gewachsen sein, da die Koloniebildung auf der 42°C-Platte durch induzierte Lyse verhindert wurde.

500 ml auf 32°C vorgewärmtes NZ-Medium wurden mit einer ÜNK von BHB2690 so angeimpft, daß eine OD_{600} von 0,08 bis 0,1 erreicht wurde. Unter guter Belüftung wurde die Kultur bei 32°C bis zu einer OD_{600} von 0,3 geschüttelt. Dann wurde unter langsamem Schütteln in einem Wasserbad bei 45°C induziert, um daraufhin unter starkem Schütteln (300 rpm) bei 37°C 3 h die Kultur zu inkubieren. Eine erfolgreiche Induktion wurde folgendermaßen überprüft: Ein Tropfen Chloroform wurde zu 2 ml Kultur gegeben, die dann nach einigen Minuten klar sein mußte. Die Bakterien wurden bei 4°C in einem Sorvall GSA-Rotor 10 min bei 8000 rpm abzentrifugiert.

Der Überstand wurde verworfen, und die Bakterien in 3 ml eiskaltem Beschallungspuffer resuspendiert. Die Zellen wurden in einem Eiswasserbad in kurzen Abständen (1 min beschallen, 2-3 min auf Eis stellen, insgesamt 20-25mal wiederholen) mit einem Ultraschallgerät (BRANSON SONIFIER, Stufe 4, 70-80 % Leistung) so lange beschallt, bis die Lösung klar erschien. Die Temperatur der Lösung sollte 4°C nicht überschreiten. Die Lösung wurde in einem Sorvall SS 34-Rotor bei 4°C und 10000 rpm 10 min zentrifugiert.

Der Überstand, der goldgelb sein sollte, wurde abpipettiert und mit dem gleichen Volumen eiskaltem Beschallungspuffer und 1/6 des Volumens an eiskaltem Packaging-Puffer vermischt. Portionen von 35 und 65 µl wurden in bei -80°C vorgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Das tiefgefrorene Lysat wurde bei -80°C aufbewahrt.

Beschallungspuffer: 1 mM EDTA; 5 mM 2-Mercaptoethanol;
3 mM $MgCl_2$; 20 mM Tris/HCl, pH 8,0.

Packaging-Puffer: 30 mM ATP; 30 mM 2-Mercaptoethanol;
20 mM $MgCl_2$; 50 mM Putrescin; 50 mM Spermidin;
6 mM Tris/HCl, pH 8,0.

II.4.6.2 "Freeze-Thaw Lysate" (FTL)

Aus dem E. coli-Stamm BHB2688 wurde das FTL gewonnen. Der einzige Unterschied zum Stamm BHB2690 besteht darin, daß, statt der Mutation im D-Gen, eine andere im E-Gen, dessen Genprodukt die Hauptkomponente des Phagenkopfes darstellt, die Ausbildung der frühesten Kopfvorstufen verhindert, alle anderen Hüllproteine aber angehäuft werden. Auch dieser Stamm wurde wie bei B.II.4.6.1 auf seine Verwendbarkeit hin getestet.

2 x 500 ml auf 32°C vorgewärmtes NZ-Medium wurden so mit einer ÜNK von BHB2688 angeimgeimpft, daß eine OD_{600} von 0,08-0,1 erreicht wurde. Die Kulturen wurden dann bei 32°C bis zu einer OD_{600} von 0,3 geschüttelt. Dann wurde in einem Wasserbad bei 45°C für 15 min induziert. Erfolgreiche Induktion wurde wie bei B.II.4.6.1 überprüft. Die Bakterien wurden dann in einem Sorvall GSA-Rotor 10 min bei 4°C und 8000 rpm abzentrifugiert und die Zellniederschläge in insgesamt 2 ml eiskalter Sucroselösung resuspendiert. Die zähflüssige Suspension wurde auf bei -80°C vorgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße gleichmäßig verteilt, mit je 25 µl frischer Lysozymlösung vorsichtig vermischt und offen in flüs-

sigem Stickstoff eingefroren. Nachdem die Suspension auf Eis (ca. eine Stunde) wiederaufgetaut war, wurden jeweils 25 µl Packaging-puffer dazugegeben und in einem Sorvall SS 34-Rotor eine Stunde bei 4°C und 20000 rpm abzentrifugiert. Die zähflüssigen Überstände wurden vereinigt und im Kühlraum in 15 und 25 µl-Portionen in bei -80°C vorgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße pipettiert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Auch der FTL wurde bei -80°C aufbewahrt.

Sucroselösung: 10 % Sucrose; 50 mM Tris/HCl, pH 7,5.

Lysozymlösung: 2 mg/ml Lysozym; 0,25 M Tris/HCl, pH 7,5.

II.4.6.3 "Packaging" der DNA

Da der SE langsamer auftaut, wurde er zuerst zum Auftauen auf Eis gestellt, 10 min später der FTL. Nachdem dieser aufgetaut war, wurden zu 10 µl FTL maximal 1 µg DNA in einem Volumen, das 2 µl nicht übersteigen durfte, gegeben, mit einer Pipettenspitze gemischt und sofort zu 15 µl noch nicht ganz aufgetautem SE transferiert. Die Extrakte wurden mit einer Pipettenspitze vorsichtig gemischt und bei RT mindestens 1-2 h inkubiert. Die Mischung wurde nun wie eine Phagenstammlösung behandelt, indem sie auf 300 µl mit SM verdünnt und dann von 10 µl der Titer bestimmt wurde.

II.4.7 λ-DNA Isolierung (Großansatz)

Zur Isolierung großer Mengen λ-DNA wurde eine nach BLATTNER et al.(1977) und MANIATIS et al. (1978) modifizierte Methode (HARTL, 1983) verwendet. Von 100 ml einer ÜNK eines geeigneten E. coli-Stammes wurde die OD_{600} gemessen und daraus die Menge an Bakterien pro ml berechnet (1 OD = 8 x 10^8 Zellen/ml).

Für einen Großansatz (2 x 500 ml) wurden je 1 x 10^{10} Zellen in einer Tischzentrifuge bei 4°C und 2500 rpm 20 min abzentrifugiert, in je 2,5 ml SM resuspendiert, mit je 5 x 10^7 pfu einer Phagenstammlösung versetzt und unter Schütteln bei 37°C 20 min inkubiert, um dann zu je 500 ml vorgewärmten NZCYM-Medium gegeben zu werden. Die Kulturen wurden bei 37°C mindestens 12 h bei 260 rpm geschüttelt. Nach diesem Zeitraum war eine deutliche Lyse der Bakterien - Zusammenballung der Zellreste und eine deutliche Klärung des Mediums - zu beobachten. Die Kulturen wurden nach Zugabe von je 10 ml Chloroform - das eine Lyse der restlichen noch nicht lysierten Bakterien bewirkt - 30 min bei 37°C geschüttelt. Nach Abkühlen auf RT wurde zu den Kulturen DNase und RNase, beide zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml, gegeben und weitere 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden pro 500 ml Kultur 29,2 g NaCl zugegeben und unter Rühren gelöst. Die Suspension wurde 1,5 h auf Eis gestellt und dann die bakteriellen Reste in einem Sorvall GSA-Rotor durch 10minütige Zentrifugation bei 9000 rpm entfernt. Die Überstände wurden vereinigt und mit PEG 6000 bis zu einer Endkonzentration von ungefähr 10 % (w/v) versetzt. Bei RT wurde das PEG langsam unter Rühren gelöst. Anschließend wurde die Suspension auf 0°C im Eiswasser abgekühlt und darin 2-3 h zur Präzipitatiion der Phagen belassen.

Die Phagen wurden dann bei 4°C in einem Sorvall GSA-Rotor bei 9000 rpm 10 min pelletiert, die Überstände verworfen, und die Zentrifugenbecher in umgestürzter Position auf saugfähiges Papier gestellt, um restliche Flüssigkeit abfließen und aufsaugen zu lassen. Das Phagenpellet wurde dann vorsichtig in 6 x 1,5 ml SM mit Hilfe einer Pasteurpipette resuspendiert, wobei darauf geachtet wurde, daß auch die an der Becherwand haftenden Phagen mitgelöst wurden. Danach wurde ein Volumenteil Chloroform dazugegeben und stark geschüttelt, sowie die Phasen anschließend in einer Tischzentrifuge bei 2500 rpm durch 10minütige Zentrifugation abgetrennt. Die obere wäßrige Phase, die die Phagen enthielt, wurde abgenommen, ohne etwas vom PEG, das als weiße Zwischenphase sichtbar war, mitzuschleppen. Die Phagenlösung wurde nach Zugabe

von 0,75 g CsCl/ml Lösung 4 h in einem Sorvall TV 865-Vertikalrotor bei 18°C und 47000 rpm zentrifugiert. Die bläulich schimmernden Phagenbanden wurden entweder von oben oder durch seitliches Anstechen des Röhrchens abgezogen, vereinigt und zur Entfernung des Cäsiumchlorids 4 x 30 min gegen je 2 Liter des folgenden Puffers, enthaltend

10 mM NaCl, 50 mM Tris/Cl, pH 8,0, und 10 mM $MgCl_2$ dialysiert.

Die dialysierte Lösung wurde mit 0,5 M EDTA, pH 8,0, 20 % SDS und Proteinase K (10 mg/ml) versetzt, so daß in einem Endvolumen von ca. 2 ml folgende Konzentrationen vorlagen:

EDTA, 20 mM; SDS, 0,5 %; Proteinase K, 50 µg/ml.

Die Lösung wurde, nachdem sie eine Stunde bei 65°C im Wasserbad inkubiert worden war, zweimal mit dem gleichen Volumen Phenol und zweimal mit dem gleichen Volumen Chloroform ausgeschüttelt. Die Phasen wurden jedesmal durch 10minütige Zentrifugation bei 4°C und 2500 rpm getrennt.

Nach Volumenbestimmung wurde 1/9 Volumen Natriumacetat (3,0 M, pH 4,8) zugefügt und sorgfältig vermischt. Die DNA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Isopropanol überschichtet und wie bei B.II.3 wurde die DNA mit Hilfe einer Pasteurpipette aufgewikkelt. Die DNA wurde dann in 500 µl TE gelöst. Der Lösungsvorgang konnte durch 5minütige Inkubation bei 65°C beschleunigt werden. Die DNA war nun für Restriktionsanalysen sauber genug, sollte sie aber für Klonierungsexperimente verwendet werden, mußte sie noch 16 h bei 4°C gegen 3 x 2 l TE dialysiert werden. Abschließend wurde die Konzentration der DNA durch Messen der OD_{260} bestimmt. Dazu wurde die DNA-Lösung in der Regel 1:50 bis 1:100 verdünnt und, um zugleich die Reinheit des Isolates zu messen, Absorptionsspektren im Wellenlängenbereich zwischen 320 und 210 nm automatisch aufgezeichnet. Das Verhältnis OD_{260} zu OD_{280} sollte mindestens 2:1 betragen. Die Ausbeute pro Liter Bakterienkultur betrug im Durchschnitt 300-400 µg Phagen-DNA.

II.5 Arbeiten mit Bakterien

II.5.1 Isolierung einzelner Kolonien

Mit einer sterilen Platinimpföse wurden entweder eine Bakterienkolonie oder durch Eintauchen in eine Glycerinkultur Bakterien aufgenommen und auf einem Sektor einer 85 mm-Platte ausgestrichen. Mit der erneut sterilisierten Impföse wurde vom Ende der bisher ausgestrichenen Bakterien aus ein weiterer Sektor ausgestrichen und dieser Vorgang 2-3mal wiederholt. Die Platte wurde anschließend bei 37°C 14-16 h inkubiert. Dann konnten gut abgetrennte Einzelkolonien, die selbst Nachkommen einer einzelnen Bakterienzelle waren, isoliert und von ihnen eine Übernachtkultur mit anschließendem Schnellaufschluß angefertigt werden.

II.5.2 Übernachtkulturen (ÜNK)

Mit einer Einzelkolonie wurde ein entsprechendes Medium angeimpft und über Nacht (12-16 h) bei 37°C unter Schütteln (260 rpm) und guter Belüftung inkubiert. Anschließend wurde die optische Dichte in einer 10 mm Küvette bei 600 nm (OD_{600}) gemessen. Dazu wurde die Kultur 1:5 verdünnt. Im allgemeinen betrug die OD_{600} 2-3, so daß (1 OD_{600} = 8 x 10^8 Zellen pro ml) mit einer Ausbeute von 1.6-2,4 x 10^9 Zellen pro ml gerechnet werden konnte.

II.5.3 Langfristiges Aufbewahren von Bakterien

Von wichtigen Bakterienstämmen und rekombinante Plasmide tragenden Bakterien wurden Glycerinkulturen angelegt, um den Verlust des Genotyps eines Stammes zu vermeiden. 850 µl einer ÜNK wurden mit 150 µl Glycerin versetzt, gut gemischt und bei -80°C eingefroren und aufbewahrt. Zur Wiederverwendung wurde mit einer sterilen Impföse an der Oberfläche gekratzt und zur Isolierung einer Einzelkolonie (B.II.5.1) auf einer 85 mm Platte ausgestrichen.

II.6 Etablieren einer Genbank (Klonieren in den Phagen λ-EMBL3)

Im λ-Genom kann ein mittlerer Abschnitt (ca. 16 kBp) zwischen den Genorten J und N ersetzt werden (CAMPBELL, 1971), ohne daß sich an der Vitalität des Phagen Entscheidendes ändern würde. Da auch noch in den beiden äußeren Abschnitten, den sogenannten Armen, einige nicht essentielle Bereiche vorhanden sind, kann man theoretisch bis zu 24 kBp durch fremde DNA ersetzen.

Nachdem im wt-Phagen in vivo (MURRAY and MURRAY, 1974) und in vitro (KLEIN and MURRAY, 1979) Restriktionsschnittstellen sowohl eliminiert als auch neu hinzugefügt waren, erhielt man zwei Typen von Vektoren, die zur Klonierung großer DNA-Fragmente geeignet waren:

1. Insertionsvektoren: hier wird DNA in eine Restriktionsschnittstelle des Vektors kloniert; Beispiele: Vektoren der λ-gt Familie (LEDER et al., 1977) und Vektoren der λ-Charon Familie (WILLIAMS and BLATTNER, 1979).

2. Substitutionsvektoren: hier wird das mittlere Fragment des Vektors durch fremde DNA ersetzt, wie bei λ-2001 (KARN et al., 1984) oder λ-EMBL3 und 4 (FRISCHAUF et al., 1983) mit einer Aufnahmekapazität von 9-24 kBp.

Im folgenden soll der in dieser Arbeit verwendete Phage λ-EMBL3 beschrieben werden, der einige Vorteile gegenüber anderen Vektoren bietet: Das Mittelstück (ca. 14 kBp) wird an beiden Enden von einem Polylinker begrenzt, der innerhalb von 20 Bp die Schnittstellen für die Enzyme - ausgehend jeweils vom Mittelstück zu den Armen hin - Eco RI, Bam HI und Sal I aufweist, so daß das Mittelstück symmetrisch bezüglich dieser Schnittstellen herausgeschnitten werden kann. Nun könnte durch Abtrennen dieses Fragments mittels Gradientenzentrifugation (MANIATIS et al., 1978; KARN et al., 1984; LOENEN and BLATTNER, 1983) eine sichere Isolation der Vektorarme erfolgen; hier wurde ein einfacherer Weg gegangen:

Durch kombinierte Spaltung mit Eco RI und Bam HI (FRISCHAUF et al., 1983) wird erreicht, daß das kurze Stück des Polylinkers bei einer Isopropanolfällung im Überstand bleibt und eine Religierung des Vektors mit den Armen zu 99 % unterdrückt wird (HARTL, 1983).

Da das Mittelstück des Vektors keine plasmidähnlichen Sequenzen enthält, treten beim Screenen von Genbanken mit nick-translatierten, Insertionen tragenden Plasmiden keine größeren Probleme auf. Ein weiterer Vorteil des Vektors liegt in der genetischen Selektion gegen das Mittelstück: Phagen, die in ihrem Mittelstück red und gam Gene (Spi Phänotyp) tragen, können nicht auf einem Wirt wachsen, der lysogen für den Bakteriophagen P2 ist. So können rekombinante Phagen auf einem P2 lysogenen Stamm selektiert werden.

Nach Abtrennen des Mittelstücks können DNA-Fragmente mit Bam HI-kompatiblen Enden im Größenbereich von 9-22 kBp an die Arme ligiert werden. Die inserierten Fragmente werden durch Schnitt mit Sal I, dessen Erkennungsstellen in den Polylinkerregionen nach dem Klonieren noch intakt sind, von den Armen abgetrennt und sind somit einer Restriktionsanalyse leicht zugänglich.

II.6.1 Vorbereiten des Vektors

10 µg der nach B.II.4.7 erhaltenen λ-EMBL3-DNA wurden mit 100 U Bam HI im nach Herstellerangaben verwendeten Puffer gespalten. Die Vollständikeit der Restriktion wurde mit 0,5 µg DNA durch Gelelektrophorese überprüft. Mit 100 U Eco RI wurde dann im selben Puffer 5 h nachgespalten. Nach einer Phenol/Chloroformextraktion wurde die DNA folgendermaßen gefällt:

Die DNA-haltige Phase wurde mit 0,12 Volumenteilen 3 M Natriumacetat, pH 6,0, gut gemischt; mit 0,6 Volumenteilen Isopropanol wurde die DNA gefällt. Nach 5 min Inkubation auf Eis wurde die DNA 5 min bei 12000 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet

wurde einmal mit 200 µl 0,45 M Natriumacetat plus 120 µl Isopropanol und einmal mit 100 µl 0,3 M Natriumacetat plus 220 µl Ethanol gewaschen. Die Überstände wurden jedesmal restlos entfernt. Das DNA-Pellet wurde schließlich in einer Vakuumzentrifuge getrocknet und in TE zu einer Konzentration von 1 µg/µl gelöst.

II.6.2 Vorbereiten der DNA-Fragmente

Hierzu wurde die Methode der partiellen Spaltung hochmolekularer genomischer DNA mit einem Enzym, das relativ häufig schneidet, gewählt. Mit der Restriktionsendonuklease Sau 3AI, die die 4 Bp lange Sequenz 5'-GATC-3' erkennt, erhielt man kompatible Enden, passend zu der von Bam HI geschnittenen Vektor-DNA.

Die Bedingungen für eine unvollständige Spaltung wurden ermittelt, indem 10 µg zelluläre DNA mit 0,5 U Sau 3AI bei 37°C gespalten wurden. Alle 10 min (insgesamt 50 min) wurde aus dem Reaktionsansatz 1 µg DNA entnommen, mit 2 µl 0.5 M EDTA, pH8,0, versetzt und bis zur Analyse mittels Gelelektrophorese in einem 0,8 %igen Agarosegel (mit λ-Bgl II- und λ-Pst I-Fragmenten als Marker) auf Eis gestellt. Die optimale Spaltzeit, in der der größte Teil der DNA in einem Längenbereich zwischen 13 und 22 kBp vorliegt, wurde zu ca. 15 min ermittelt.

In einem Großansatz, in dem 300-400 µg DNA eingesetzt wurden, blieb die Enzymkonzentration bezüglich DNA und Volumen konstant. 5 min vor Ablauf der optimalen Spaltzeit wurde die Hälfte des Ansatzes entnommen, mit 100 µl EDTA (0,5 M, pH 8,0) die Reaktion gestoppt und auf Eis gestellt. Der Rest des Ansatzes blieb bis 5 min nach Ablauf der optimalen Spaltzeit bei 37°C. Nach Zugabe von 100 µl EDTA (0,5 M, ph 8,0) wurden beide Aliquots vereint und zweimal mit Phenol/Chloroform extrahiert. Die Phasen wurden durch 3minütige Zentrifugation in einer Eppendorfzentrifuge getrennt. Nach einer Ethanolfällung (B.II.2.4) wurde die DNA in 200 µl TE gelöst.

Die Isolierung der DNA-Fragmente im Größenbereich 12-22 kBp erfolgte durch CsCl-Gradientenzentrifugation. Mit Hilfe eines HÖLZEL-Gradientenmischers wurde aus 5,4 ml CsCl-Lösung der Dichte 1,500 und 5,7 ml CsCl-Lösung der Dichte 1,326 ein kontinuierlicher CsCl-Gradient hergestellt. Die CsCl-Lösungen wurden wie folgt zusammengemischt:

1. CsCl-Lösung der Dichte 1,500: 34 g CsCl; 40,5 ml H_2O; 0,5 ml Puffer (1 M Tris/Cl, pH 8,0; 0,1 M EDTA). Genaue Einstellung der Dichte erreichte man durch Bestimmung des Refraktionsindex:

$\rho = 1,381$.

2. CsCl-Lösung der Dichte 1,326: 22,1 g CsCl; 43,5 ml H_2O; 0,5 ml Puffer (1 M Tris/Cl, pH 8,0; 0,1 M EDTA).
Refraktionsindex: $\rho = 1,365$.

Die Lösung der partiell gespaltenen DNA wurde, nachdem sie 5 min auf 65°C erhitzt worden war, auf den Gradienten aufgetragen und in einem BECKMANN SW 41-Ausschwingrotor 20 h bei 20000 rpm zentrifugiert. Der Röhrchenboden wurde dann angestochen und der Gradient in Fraktionen von 0,5 ml aufgeteilt. 25 µl-Aliquots aller Fraktionen wurden in einem 0.8 %igen Agarosegel aufgetragen und die Längenverteilung der DNA-Fragmente bestimmt. Diejenigen Fraktionen, die den Bereich zwischen 13 und 22 kBp abdeckten, wurden vereinigt, und folgendermaßen die DNA gefällt: Zu 1 Volumenteil CsCl-Gradient wurden 7,75 Volumenteile $H_2O_{bid.}$ und 17,5 Volumenteile Ethanol (abs.) gegeben und nach gründlichem Schütteln 30 min bei -20°C inkubiert. Die präzipitierte DNA wurde bei 0°C in einem BECKMANN SW 41 Ausschwingrotor 30 min bei 30000 rpm abzentrifugiert, in 200 µl TE aufgenommen und nochmals mit Ethanol gefällt (B.II.2.4). Die in 95 µl TE aufgenommene DNA wurde mit 5 µl RAP-Puffer (20 x) und 4 U calf intestine phosphatase (CIP) versetzt. Die Abspaltung der 5'-Phosphatreste erfolgte 1,5 h bei 37°C.

Zur Inaktivierung der Phosphatase wurde 1/9 Volumenteil 0,1 M NTA zugesetzt und 45 min bei 68°C inkubiert. Nach Phenolextraktion und Ethanolfällung wurde das Pellet so in TE gelöst, daß eine ungefähre Konzentration von 0,5 µg DNA/µl vorlag. Die Ausbeute an klonierbarer DNA im Längenbereich 12-22 kBp lag bei 10 µg, das entsprach ungefähr 5 % der eingesetzten DNA-Menge.

RAP-puffer (20 x konz.): 1 M Tris/HCl, pH 8,0; 100 mM $MgCl_2$; 20 mM $ZnCl_2$; 20 mM Spermidin.

II.6.3 Ligierung und "Packaging" der DNA

Zu 2,5 µg genomischer DNA und 5 µg λ-EMBL3 DNA wurden 4 µl 5 x Ligierungspuffer (nach Herstellerangaben) und 1 U T4 - DNA-Ligase pipettiert (Gesamtansatz: 20 µl) und über Nacht (mind. 16 h) bei 16°C inkubiert. Zur Kontrolle einer vollständigen Vektorspaltung wurde der Vektor ohne genomische DNA, deren Volumen durch $H_2O_{bid.}$ ersetzt wurde, ligiert. Mit 1 µl des Ligierungsansatzes wurde die Effizienz der Ligierung durch Gelelektrophorese in einem 0,6 %igen Agarosegel überprüft. War die Ligierung vollständig, so wurden 1,5 µl-Aliquots des Ligierungsansatzes und der Kontrolligierung nach (B.II.4.6.3) verpackt und anschließend der Titer bestimmt.

II.6.4 Amplifikation der Genbanken

Die verschiedenen Genbanken wurden auf folgende Weise amplifiziert: Je 200 µl einer Infektionskultur wurden mit je 5 x 10^4 pfu des "packaging mix" infiziert und mit je 7 ml Topagarose auf 135 mm Platten ausplattiert. Nach genau 8stündiger Inkubation bei 37°C - die einzelnen Plaques durften nicht zu groß werden, sie sollten sich gerade erst berühren, da eine Doppelinfektion zu einem Rekombinationsereignis führen könnte - wurde jede Platte mit 12 ml SM überschichtet, so daß die gesamte Oberfläche mit SM

bedeckt war. Anschließend wurde über Nacht (16 h) bei 4°C inkubiert. Die Überstände wurden abgezogen und in einer sterilen Flasche gesammelt. Mit je 4 ml SM wurden die Platten nachgespült. Die gesammelten Überstände wurden mit 1 % Chloroform versetzt und durch langsames Schütteln (2 h) gemischt. Der Titer wurde bestimmt und Aliquots nach B.II.4.5 aufbewahrt.

II.7 Restriktionsspaltungen, DNA-Gele

II.7.1 Restriktionsspaltungen der DNA

Typischerweise wurden für analytische Zwecke 0,5-2 µg DNA in den von den Herstellerfirmen empfohlenen Puffern 1-3 h bei 37°C mit 5-40 Enzymeinheiten gespalten. Fand eine DNA-Spaltung mit zwei oder drei Enzymen statt, so wurde die Reaktion zunächst mit den Enzymen durchgeführt, die einen Spaltpuffer niedrigeren Salzgehaltes benötigten. Nach entsprechender Erhöhung des Salzgehaltes konnte dann die DNA mit den weiteren Enzymen gespalten werden. Für präparative Zwecke wurde die Menge der zugesetzten Enzymeinheiten den erhöhten DNA-Mengen angepaßt.

Wurden die DNA-Fragmente sofort durch Gelelektrophorese im Agarosegel analysiert, so wurde nach Verdau ca. 1/5 Volumenteil Probenauftragspuffer zugesetzt und die DNA-Lösung (bei Phagen-DNA-Verdau erfolgte noch eine 5minütige Inkubation bei 65°C zur Trennung der cos-sites) auf das Gel aufgetragen. Wurde die DNA kurzfristig aufbewahrt, so wurde EDTA (0,5 M, pH 8,0) zu einer Endkonzentration von 50 mM zugesetzt und die Lösung bei 0°C bis zur Analyse gehalten.

Probenauftragspuffer: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA, pH 8,0;
1 % SDS; 0,1 mg/ml Bromphenolblau;
25 µg/ml Xylencyanol; 30 % Glycerin.

II.7.2 Auftrennung der DNA-Fragmente duch Agarosegelelektrophorese

Je nach erwarteter Größe der DNA-Fragmente wurden 0,8-1,5 %ige Agarosegele (Geldicke: 0,3-0,5 cm) verwendet, die entweder in horizontalen Gelträgern (10 x 8 oder 20 x 20 cm) oder vertikalen Gelträgern (13 x 19 cm) im Tris/Acetat-Puffersystem gefahren wurden. Nach genügender Auftrennung der DNA-Banden wurden die Gele in 1 µg/ml Ethidiumbromid gefärbt und mit UV-Licht (302 nm) durchstrahlt. Die nun sichtbaren Banden wurden mit Polaroidfilmen (Typ 667/3000 ASA) oder Ilford HP5-Filmen (400 ASA) fotografiert. Zum Größenvergleich wurden λ-Pst I-Fragmente und bei Phagenrestriktion zusätzlich λ-Bgl II-Fragmente mit aufgetragen.

Tris/Acetat-Puffer: 40 mM Tris/Acetat, pH 7,8; 5 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA (MANIATIS et al., 1982).

Längen der λ-Pst I-Fragmente (Bp):

11497/ 5077/ 4749/ 4507/ 2838/ 2560/ 2459/ 2443/ 2140/ 1986/
1700/ 1159/ 1093/ 805/ 514/ 468/ 448/ 339/ 264/ 247/
216/ 211/ 200/ 164/ 150/ 94/ 87/ 72/ 15

Längen der λ-Bgl II-Fragmente (Bp):

22010/ 13286/ 9688/ 2392/ 651/ 415/ 60

II.7.3 Alkalische Agarosegel-Elektrophorese

Die Längenbestimmung nick-translatierter DNA-Fragmente wurde mittels alkalischer Agarosegel-Elektrophorese (McDONNELL, 1977) durchgeführt. Dazu wurde die Agarose (2 %; w/v) in 30 mM NaCl, 2 mM EDTA gelöst, das Gel in einer Horizontalgelapparatur (McDONNELL, 1977) gegossen und nach Erstarren zum Äquilibrieren mit dem alkalischen Puffer (30 mM NaOH, 2 mM EDTA) 30 min überschichtet.

Die zu untersuchende Probe (s. B.II.8.1) wurde mit Probenauftragspuffer versetzt und so lange mit einer Spannung von 1-5 V/cm elektrophoretisiert, bis das Bromphenolblau ca. 10 cm eingewandert war. Nach dem Lauf wurden die Gele in 10 %iger Essigsäure neutralisiert, über Nacht getrocknet und autoradiographiert.

II.8 Radioaktive Markierung der DNA

II.8.1 Nick-Translation

Das Plasmid pHC4e (VOIT, 1986) oder DNA-Fragmente wurden in einem Nick-Translationsansatz (RIGBY et al., 1977) folgendermaßen mit ^{32}P markiert:

50 mM	Tris/HCl, pH 7,5
10 mM	$MgCl_2$
1 mM	DTT
je 25 µM	dCTP, dGTP, dTTP
25-50 µCi	α-^{32}P-dATP (3000 Ci/mM)
0,5-1 µg	DNA
0,2-0,5 ng	DNase I (je nach Länge der DNA-Fragmente)
5 U	E. coli DNA-Polymerase I

H_2O ad 40 µl.

Der Reaktionsansatz wurde 60 min bei 16°C inkubiert. Mit 5 µl EDTA 0,5 M, pH 8,0, und Abkühlen auf 0°C wurde die Reaktion abgestoppt. Die nicht eingebauten Triphosphate wurden von der markierten DNA durch Zentrifugation über eine Sephadex G-50 fine-Säule abgetrennt. Dazu wurde eine blaue Eppendorfpipettenspitze mit Glaswolle abgedichtet und nach Sterilisierung mit sterilem Sephadex G-50 fine in TE auf ca. 1,5 ml aufgefüllt und in ein leeres Eppendorfgefäß gestellt. In einer SPEED-VAC-Zentrifuge wurde die kleine Säule 4 x 1,5 min mit je 100 µl STE-Puffer äquilibriert. Dann wurde der auf 100 µl mit STE-Puffer aufgefüllte Nick-Translationsansatz auf die Säule gegeben und ebenfalls 1,5 min zentrifugiert. Mit weiteren 100 µl STE-Puffer wurde nochmals markierte DNA von der Säule gewaschen. Dieser Vorgang wurde siebenmal wiederholt. 0,5 % der ersten beiden Fraktionen wurde in einem denaturierenden Gel nach McDONNELL (1977) überprüft. Der Gehalt dieser Fraktionen an Radioaktivität wurde durch Entnahme von jeweils 1 % der Fraktionen in einem Szintillationszähler bestimmt. Normalerweise betrug die spezifische Aktivität 2-5 x 10^7 cpm/µg DNA.

II.8.2 Markierung über Random-Hexamer-Priming nach FEINBERG and VOGELSTEIN (1983, 1984)

Dieses Verfahren wurde zur Markierung von isolierten DNA-Fragmenten benutzt, deren Länge für eine Nick-Translation zu gering war. Folgendes Prinzip liegt dieser Reaktion zugrunde: An die einzelsträngige Sonden-DNA binden an beliebiger Stelle die als Primer eingesetzten Oligonukleotide (hier Hexamere) und ermöglichen mit ihrem freien 3'OH-Ende den Start der Synthese des zweiten DNA-Stranges durch die Klenow-Polymerase, wobei die Reaktionsbedingungen so gewählt wurden, daß auch markierte Nukleotide eingebaut wurden. Der Reaktionsansatz hatte typischerweise folgende Zusammensetzung:

11,5 µl LS-Mix (44 µM dCTP, dGTP und dTTP; Hexamere OD von 11; 100 mM Tris/HCl, pH 7,8; 11 mM $MgCl_2$; 22 mM MET; 440 mM HEPES, pH 6,6)
50 µCi α-^{32}P-dATP (3000 Ci/mM)
6,0 µl DNA (50-500 ng), 5 min hitzedenaturiert
2,5 µl Klenow-Polymerase (1 U/µl)

Die Reaktion wurde 5 h bei RT durchgeführt und anschließend mit 2,5 µl 250 mM EDTA und 72,5 µl TE, pH 8,0, abgestoppt. Die markierte DNA wurde wie unter B.II.8.1 von den Hexameren und radioaktiven Nukleotiden abgetrennt und ein Aliquot zur Bestimmung der Einbaurate wie unter B.II.8.1 beschrieben entnommen.

II.8.3 Endmarkierung von synthetischen Oligonukleotiden

Die für das "Kupfer A"-Zentrum und speziell für die Hc UEe codierenden 17mer Oligonukleotide waren auf einem DNA-Synthesizer der Firma APPLIED BIOSYSTEMS nach der Phosphoramidit-Methode (DÖRPER and WINNACKER, 1983) hergestellt worden. Dabei waren bereits die basenspezifischen Schutzgruppen und die Schutzgruppen am 5'-Ende des Oligonukleotids entfernt, als auch das Oligonukleotid selbst über HPLC gereinigt worden. So konnte das Oligonukleotid ohne weitere Reaktionsschritte mit γ-^{32}P-ATP am 5'-Ende markiert werden. Der Reaktionsansatz war ähnlich wie bei WOODS (1984) und MANIATIS et al. (1982) beschrieben:

60 mM Tris/HCl, pH 7,6
10 mM $MgCl_2$
10 mM DTT
8-10 pM 5'Enden der Olgonukleotide
30-50 µCi γ-^{32}P-ATP
5 U T4-Polynukleotidkinase
H_2O ad 20 µl

Die Reaktion wurde bei 37°C 60 min durchgeführt und mit 1 µl EDTA (0,5 M) abgestoppt. Die nicht eingebauten γ-^{32}P-ATP-Nukleotide wurden über eine DEAE-Cellulose DE-52 Säule abgetrennt. Das Säulenmaterial war zuvor mit 10 mM Tris/HCl, pH 7,4, 1 mM EDTA + 0,2 M NaCl äquilibriert worden. Zum Reaktionsansatz wurden vor dem Auftragen auf die Säule 10 µl 1 M NaCl und 20 µl TE gegeben. Nicht eingebaute Nukleotide wurden zuerst 4-5mal mit je 200 µl 0,2 M NaCl/TE-Puffer und 2minütiger Zentrifugation in einer SPEED-VAC-Zentrifuge abgetrennt. Die markierten Oligonukleotide wurden dann mit 1 M NaCl/TE-Puffer von der Säule eluiert. Fraktionen mit den höchsten Radioaktivitäten, die mittels Flüssigkeitsszintillation ermittelt worden waren, wurden vereinigt. Die Ausbeute betrug durchschnittlich 2 x 10^7 cpm/50 ng DNA.

II.9 Markierung von DNA mit biotinylierten Nukleotiden

Als Alternative zur Markierung mit α-^{32}P-dATP wurde bio-11-dUTP in einem Nick-Translationsansatz (RIGBY et al., 1977) verwendet:

50	mM Tris/HCl, pH 7,8
5	mM $MgCl_2$
10	mM 2-Mercaptoethanol
10	µg/ml BSA
20	µM dATP, dCTP, dGTP
20	µM bio-11-dUTP
0,5-1	µg DNA
0,2-0,5	ng DNase
10	U E. coli DNA-Polymerase I
H_2O ad 50	µl

Die Nick-Translationsreaktion wurde bei 16°C 50 min durchgeführt. Abgestoppt wurde mit 5 µl 0,5 M EDTA und 1 µl 10 % SDS. Die biotinmarkierte DNA wurde auf folgende Weise von nicht eingebauten bio-11-dUTP Nukleotiden abgetrennt: Zum Reaktionsansatz

wurde 11 µl 3 M Natriumacetat, pH 4,8, dazupipettiert, vermischt und mit 40 µl Isopropanol 10 min bei RT die DNA gefällt. Nach 10minütiger Zentrifugation bei 12000 x g und 4°C wurde der Überstand verworfen, und das Pellet, nachdem es einmal mit 70 %igem Ethanol gewaschen worden war, getrocknet und in 100 µl TE gelöst. Nach Ermitteln der Nachweisgrenze mit einem Aliquot dieser Probe in einem "dot-blot"-Test (LEARY et al., 1983), wurden die markierten Proben ausschließlich als Hybridisierungsprobe nach Southernblots (B.II.11.4) eingesetzt.

II.10 Screening von genomischen Genbanken

Um eine Genbank, die nach B.II.6 etabliert wurde, auf bestimmte Klone hin zu untersuchen, wurden 6 x 10^5 pfu verwendet. Mit je 3 x 10^4 pfu wurden 200 µl einer Infektionskultur infiziert (B.II.4.1 und B.II.6.4) und auf 135 mm BBL-Platten ausplattiert. Von jeder Platte wurden nun Doppelnitrozellulosefilterabzüge gemacht (BENTON and DAVIS, 1977).

II.10.1 Plaquefixierung und Nitrozellulosefilterabzüge

Dazu wurde ein am Rand mit drei asymmetrischen Kugelschreiberstrichen markierter Nitrozellulosefilter auf eine BBl-Platte gelegt, die zuvor mindestens 2 h zum Verfestigen des Agars bei 6°C aufbewahrt worden war. Es wurde darauf geachtet, daß keine Luftblasen zwischen Platte und Filter eingeschlossen wurden. Die durch den Agar sichtbaren Randmarkierungen der Filter wurden auf den Boden der BBL-Platte übertragen. Zudem wurde in Randnähe des Rundfilters dessen Lage ein zweitesmal bestimmt, indem an drei Stellen mit einer leicht in Tinte eingetauchten Injektionsnadel durch den Filter in den Agar gestochen wurde. Nach 1-2 min wurde der Filter abgenommen (der Replikafilter wurde 2-3 min auf der BBL-Platte belassen), 1-2 min in Denaturierungspuffer, dann 1-2 min in Neutralisierunspuffer und 1-2 min in 2 x SSC äquilibriert,

um abschließend auf einem Bogen WHATMAN 3MM Papier gelegt und an Luft getrocknet zu werden. Die Filter wurden in den jeweiligen Lösungen mit der der Topagarose zugewandten Seite nach oben auf WHATMAN 3MM Papier gelegt, das mit der entsprechenden Lösung durchtränkt war. Die an Luft getrockneten Filter wurden schließlich zum Hitzefixieren der DNA 2 h bei 80°C gebacken und anschließend bei RT gelagert.

Denaturierungspuffer: 1,5 M NaCl; 0,5 M NaOH.

Neutralisierungspuffer: 1,5 M NaCl; 0,5 M Tris/HCl, pH 7,5.

II.10.2 Plaquehybridisierung mit nick-translatierter DNA als Hybridisierungsprobe

Die in 2 x SSC angefeuchteten Nitrozellulosefilter wurden 4 h bei 42°C in Prähybridisierungslösung mit folgender Zusammensetzung inkubiert:

50 % Formamid (deionisiert mit BIORAD AG501-X08)
6 x SSC
5 x Denhardt's Lösung
0,1 % SDS
100 µg/ml denaturierte Lachs-DNA

Die Prähybridisierungslösung wurde durch Hybridisierungspuffer gleicher Zusammensetzung ersetzt. Die durch Nick-Translation radioaktiv markierte DNA wurde 10 min bei 100°C denaturiert, 5 min auf Eis abgekühlt und dann dem Hybridisierungspuffer zugegeben. Maximal 10 120 mm Filter wurden in Folie mit 25-30 ml Hybridisierungslösung und 3-4 x 10^7 cpm radioaktiv markierter DNA eingeschweißt und über Nacht bei 42°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Danach wurde die Hybridisierungslösung abgegossen und bei -20°C aufbewahrt. Sie wurde nach erneutem Aufkochen und Abschrecken bis

zu dreimal verwendet. Die Filter wurden, um unspezifisch gebundene DNA zu entfernen, zweimal je 10 min mit 2 x SSC/0,1 % SDS Lösung bei RT und zweimal je 30 min mit 0,1 x SSC/0,1 % SDS Lösung bei 60-65°C gewaschen und auf WHATMAN 3MM Papier getrocknet. An Stellen, die mit der Injektionsnadel markiert worden waren, wurde radioaktive Tinte aufgetragen. Die möglichst noch etwas feuchten Filter wurden in Haushaltsfolie eingewickelt und zusammen mit einem Röntgenfilm (KODAK X-OMAT AR) unter Verwendung von Verstärkerfolien (KODAK, QUANTA III) zwischen 4 h und 3 Tagen bei -80°C exponiert.

II.10.3 Reinigung positiver Klone

Phagen, deren DNA entsprechend B.II.10.2 ein positives Signal ergab, wurden wie nach B.II.4.4 isoliert. Dazu wurde die Umgebung des Signals nach Vergleich des Röntgenfilms mit der BBL-Platte in einem Durchmesser von 5-6 mm aus der Topagarose ausgestochen, da durch nicht zu vermeidende Schrumpfung der Nitrozelllulosefilter die exakte Position des positiven Klons nicht ermittelt werden konnte. Von 10 µl der Phagensuspension wurde eine 10^3fache Verdünnung auf eine 85 mm BBL-Platte ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Nachdem von dieser Platte erneut ein Doppelfilterabzug und die entsprechende Hybridisierung durchgeführt worden war, wurde ein Plaque, der einem positiven Signal entsprach, ausgestochen. Von 10 µl dieser Phagensuspension wurde eine 10^4fache Verdünnung ausplattiert. Nach Nitrozellulosefilterabzug und Hybridisierung (s.o.) wurde nochmal ein Plaque, entsprechend einem positiven Signal, ausgestochen. Dieses Verfahren wurde solange wiederholt, bis alle Plaques einer Platte ein positives Signal ergaben. Normalerweise war dies nach drei Reinigungsschritten der Fall. Diese Phagen waren alle Nachkommen des Ausgangsphagen, der mit dieser Methode der schrittweisen Ausdünnung von den benachbarten Phagen abgetrennt und gereinigt worden war. Nun konnte der Genotyp dieses Phagen durch Restriktionskartierung (B.II.11.1) seiner DNA festgelegt werden.

II.10.4 Schnellaufschluß der Phagen

Da die nach B.II.4.7 beschriebene Isolierung von Phagen-DNA relativ mühsam und zeitaufwendig ist, wurde, um viele Phagengenotypen möglichst schnell zu charakterisieren, auf die "liquid culture"-Methode (LEDER, 1977) zurückgegriffen:

Ein Einzelphage wurde gepickt, in 1 ml SM gegeben und 4-6 h bei 4°C aufbewahrt. In einem sterilen 10 ml Plastikröhrchen wurden 25 µl einer Infektionskultur mit 500 µl der Phagensuspension infiziert und 15 min bei 37°C inkubiert. Dann wurden 4 ml NZCYM-Medium hinzupipettiert und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Nach Zugabe von 100 µl Chloroform wurde weitere 15 min bei 37°C inkubiert. Die Zellreste wurden durch Zentrifugation bei 8000 rpm in einem SORVALL SS 34-Rotor 10 min bei 4°C entfernt und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß pipettiert. Nach Zugabe von RNase A und DNase I bis zu einer jeweiligen Konzentration von 1 µg/ml wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Mit einem gleichen Volumen SM (20 % PEG 6000; 2 M NaCl) wurden die Phagen während einer einstündigen Inkubation bei 0°C gefällt. Nach Abzentrifugation der Phagen bei 4°C und 10000 rpm in einem SORVALL SS 34-Rotor wurde der Überstand abgegossen und das Plastikröhrchen in gestürzter Position auf saugfähiges Papier gestellt, damit restliche Flüssigkeit abfließen konnte. Das Phagenpellet wurde durch starkes Schütteln in 0,5 ml SM resuspendiert. Die Suspension wurde dann 2 min bei 4°C in einer SIGMA Tischkühlzentrifuge bei 8000 rpm abzeuntrifugiert, um eventuelle Bakterienreste und restliches PEG zu entfernen. Der Überstand wurde in einem frischen Eppendorfreaktionsgefäß mit 5 µl 10 % SDS-Lösung und 5 µl 0,5 M EDTA versetzt und 15 min bei 68°C inkubiert. Die Lösung wurde einmal mit Phenol und zweimal mit Phenol/Chloroform ausgeschüttelt und mit dem gleichen Volumen Isopropanol wurde die DNA 15 min bei -80°C gefällt. Nachdem die Lösung aufgetaut war, wurde die DNA 15 min bei 4°C und 12000 x g abzentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in 15 µl TE aufgenommen.

II.11 Analyse rekombinanter Klone

II.11.1 Kombinierte Restriktionsenzymspaltung

Jeweils 1,5 µg der isolierten Phagen-DNA (B.II.10.4) wurden mit 1 µg RNase versetzt und nach (B.II.7.1) mit folgenden Enzymkombinationen gespalten:

1. Bam HI (B)	2. Eco RI (E)	3. Hind III (H)	4. Sal I (S)
5. B/S	6. E/S	7. H/S	
8. B/E/S	9. B/H/S	10. E/H/S	

Mit den ersten drei Spaltungen ohne Sal I konnten nach Gelelektrophorese im 0,8 %igen Agarosegel die Lage des Mittelstücks bezüglich der Arme, sowie die erste Schnittstelle der jeweiligen Enzyme festgelegt werden. Die Summe der Fragmentlängen der Sal I-Spaltung bestimmte die Länge der Insertion. Durch die kombinierten Enzymspaltungen aller vier Enzyme ließen sich Restriktionskarten der klonierten DNA-Fragmente erstellen. Zur genauen Bestimmung einzelner Bereiche wurde die DNA nach Gelelektrophorese gemäß B.II.11.2 auf Nitrozellulose übertragen und mit verschiedenen Proben (B.II.11.3-11.4) hybridisiert.

II.11.2 "Southern-Transfer" von DNA auf Nitrozellulosefilter

Zur genaueren Charakterisierung einzelner Klone wurde die DNA der Fragmente nach Restriktionsverdau und Gelelektrophorese aus dem Agarosegel auf Nitrozellulosefilter übertragen. Dazu fand die Methode nach SOUTHERN (1975) Verwendung:

Das Gel wurde 10-15 min in 0,2 M HCl gelegt, die Salzsäure abgeschüttet und kurz mit Wasser nachgespült. Dann wurde das Gel 2 x je 15 min in 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH denaturiert und schließlich 2 x je 30 min in 1,5 M NaCl, 0,5 M Tris/HCl von pH 7,5 neutralisiert. Über eine Glasbrücke wurde ein mit 20 x SSC befeuch-

teter Streifen WHATMAN 3MM-Papier so gelegt, daß er in ein mit 20 x SSC gefülltes Vorratsgefäß tauchte. Darauf wurde nun das neutralisierte Gel gelegt und über dieses ein in 2 x SSC äquilibrierter Nitrozellulosefilter gleicher Größe. Die Ränder wurden 4 mm breit mit 4 cm breiten Parafilmstreifen abgedeckt, so daß ein Kurzschluß beim DNA-Transfer durch seitliches, am Gel vorbeiziehendes SSC vermieden wurde. Auf den Nitrozellulosefilter wurden zwei in 2 x SSC getränkte Bogen WHATMAN 3MM-Papier gleicher Größe gelegt und mit einem ca. 5 cm hohen Stapel saugfähiger Papierhandtücher beschichtet. Dieser Aufbau wurde mit einem 1 kg schweren Gewicht beschwert. Die Transferdauer betrug mindestens 16 h; danach wurden die Nitrozellulosefilter 30 min in 2 x SSC gewaschen, luftgetrocknet und die DNA der Banden durch zweistündiges Erhitzen auf 80°C auf die Filter fixiert.

II.11.3 Hybridisierung mit ^{32}P-nick-translatierter Proben-DNA

Vorhybridisierung und Hybridisierung von "Southern-Blots" (B.II.11.2) wurden unter den gleichen Bedingungen wie bei Plaquehybridisierung (B.II.10.2) durchgeführt.

II.11.4 Hybridisierung mit ^{32}P-endmarkierten Oligonukleotidproben

Hier wurde ein nach WALLACE et al. (1981) und WOODS (1984) modifiziertes Verfahren angewendet. Die auf Nitrozellulosefilter fixierte DNA (B.II.11.2) wurde 4 h bei 60°C in folgendem Puffer vorhybridisiert:

6 x SSC
0,5 % SDS
100 µg/ml denaturierte Lachs-DNA
5 x Denhardt's Lösung
0,05 % (w,v) Natriumpyrophosphat

Zur Hybridisierung wurde der Puffer mit einer Lösung gleicher Zusammensetzung, die zusätzlich 1-2 x 10^6 cpm/ml markierte ^{32}P-Oligonukleotide enthielt, ausgetauscht und 16 h bei 40-42°C inkubiert. Die Waschtemperaturen für die Filter mußten so gewählt werden, daß nur perfekt assoziierte Hybride stabil bleiben, während mit falschen Basenpaarungen zusammengesetzte Hybride auseinanderfallen sollten. Für Oligonukleotidgemische wurde die niedrigste optimale Temperatur gewählt, die sogenannte T_{Dmin}, wie sie aus der Basenzusammensetzung errechnet werden kann (SZOSTAK et al., 1979):

T_D = 4°C je G/C Basenpaarung + 2°C je A/T Basenpaarung

Daraus konnten aus der Basenzusammensetzung der Oligonukleotidgemische folgende T_{Dmin} und T_{Dmax} errechnet werden:

"Kupfer A"-Oligonukleotidprobe: T_{Dmin} = 50°C
T_{Dmax} = 56°C

Hc UEe spezifische Oligonukleotidprobe: T_{Dmin} = 44°C
T_{Dmax} = 54°C

Die Filter wurden nach Hybridisierung zuerst zweimal 15 min bei RT, dann unter T_{Dmin}-Bedingungen 5 min jeweils in 6 x SSC, 0,1 % SDS gewaschen, kurz an Luft getrocknet und noch feucht in Haushaltsfolie eingeschlagen. Mit KODAK X-OMAT AR Röntgenfilmen zwischen zwei Verstärkerfolien wurde bei -80°C 4-24 h autoradiographiert. War der Hintergrund zu stark, so wurden die Filter nochmals bei höherer Temperatur 2-5 min gewaschen.

II.11.5 Hybridisierung mit bio-11-dUTP markierten DNA-Fragmenten

Als Alternative zur näheren Charakterisierung einzelner DNA-Banden nach "Southern-Transfer" mit ^{32}P-nick-translatierter Proben-DNA wurde mit bio-11-dUTP markierten DNA-Fragmenten hybridisiert (LEARY et al., 1983). Im wesentlichen hielt ich mich an die von ENZO BIOCHEM mitgelieferten Versuchsanleitungen :

Die nach "Southern-Transfer" 2 h gebackenen Filter wurden kurz mit 6 x SSC befeuchtet und in folgender Lösung 4 h bei 42°C vorhybridisiert:

50 % Formamid
5 x SSC
25 mM Na_3PO_4
5 x Denhardt's Lösung
250 µg/ml denaturierte Lachs-DNA

Zur Hybridisierung, die über Nacht mindestens 16 h bei 42°C erfolgte, wurde der Puffer durch folgenden ersetzt:

45 % Formamid
5 x SSC
25 mM Na_3PO_4
250 µg/ml den. Lachs-DNA
10 % Dextransulfat
100 µl den. bio-11-dUTP markierte Probe
H_2O ad 10 ml

Mit 10 ml Lösung wurden höchstens 100 cm² Filter hybridisiert. Nach Hybridisierung wurden die Filter folgendermaßen in je 250 ml Lösung gewaschen:

2 x 5 min	2 x SSC/0,1 % SDS	bei RT
2 x 5 min	0,2 x SSC/0,1 % SDS	bei RT
2 x 15 min	0,2 x SSC/0,1 % SDS	bei 50°C;

anschließend in reichlich 2 x SSC, um SDS zu entfernen.

Die hybridisierenden DNA-Banden wurden in vier Arbeitsschritten detektiert (alle Angaben beziehen sich auf max. 100 cm² Filter):

1. Der Filter wurde in Folie mit 8 ml Blocking-Puffer und 2 ml 10 % BSA eingeschweißt und bei RT 30 min langsam auf einem Rotationsschüttler bewegt. Dann wurde der Puffer entfernt und durch
2. 1,5 ml Complex-dilution-Puffer
   + 1,5 µl 10% BSA
   + 7,5 µl Streptavidin-alkaline Phosphatase Complex

   ersetzt.

   Die Lösungen wurden zuvor gut gemischt und es wurde darauf geachtet, daß der Filter luftblasenfrei eingeschweißt wurde. Der Filter wurde 45 min bei RT inkubiert, indem gelegentlich mit der Hand die Lösung über den Filter verstrichen wurde. Nachdem der Filter aus der Folie herausgenommen war, wurde er
3. 5 x 5 min mit je 50 ml Waschpuffer

   (insges. 200 ml Waschpuffer + 50 ml 10 % BSA) gewaschen. Nachdem der Filter 2 x je 2 min in je 50 ml Predetection-Puffer inkubiert worden war, wurden die hybridsierenden DNA-Banden in
4. der Farbreaktion sichtbar gemacht.

   Dazu wurde der Filter in Folie mit

   7,5 ml Predetection-Puffer
   + 33 µl NBT
   + 25 µl BCIP,

die erst kurz vor Gebrauch gemischt worden waren, eingeschweißt und im Dunkeln bei RT inkubiert. Nach spätestens 3-4 h waren die ersten bläulich schimmernden Banden zu sehen. Fand zu diesem Zeitpunkt keine Farbreaktion mehr statt - die Lösung war nicht mehr gelblich - wurde der alte Puffer durch neuen mit gleicher Zusammensetzung ersetzt und über Nacht inkubiert.

Die Farbreaktion wurde gestoppt, indem der Filter kurz in Wasser gewaschen und auf WHATMAN 3 MM Papier an Luft getrocknet wurde. Die trockenen Filter wurden zwischen WHATMAN 3 MM Papier in Folie eingeschweißt und bei RT aufgehoben. Zum Photographieren (ILFORD HP5; Gelbfilter) wurden die Filter befeuchtet, um die verblaßten Farben wieder zu verstärken.

Blocking-Puffer Stammlösung: 1 x PBS; 0,05 % Triton X-100; 5 mM EDTA; Gebrauchslösung mit 2 % BSA.

Complex-dilution-Puffer Stammlösung: 1 x PBS; 0,5 % Triton X-100; 5 mM EDTA; Gebrauchslösung mit 0,1 % BSA.

Predetection-Puffer: 100 mM Tris/HCl, pH 8,8; 100 mM NaCl; 5 mM $MgCl_2$.

Waschpuffer Stammlösung: je 5 mM KH_2PO_4 und K_2HPO_4, pH 6,5; 0,5 M NaCl; 0,5 % Triton X-100; 1 mM EDTA; Gebrauchslösung mit 2 % BSA.

NBT: Nitroblau-Tetrazolium; 75 mg NBT in 0,7 ml Dimethylformamid und 0,3 ml H_2O lösen; im Dunkeln aufbewahren.

BCIP: 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat; 50 mg BCIP in 1 ml Dimethylformamid lösen; im Dunkeln aufbewahren.

II.12 Subklonieren in Plasmide

Bakterielle Plasmide können als Vektoren fremder DNA benutzt werden, indem sie und die fremde DNA mit geeigneten Restriktionsenzymen gespalten und beide in einem Ansatz zusammen ligiert werden. Außer der Methode der "blunt end"-Ligierung, bei der glatte Enden wieder zusammengefügt werden, wurde häufiger die Methode der Ligierung überlappender, kompatibler Enden und das sogenannte "shot gun"-Klonieren verwendet. Beim letzteren wurde das zu analysierende DNA-Fragment nicht von den anderen, im Reaktionsgemisch vorhandenen DNA-Fragmenten abgetrennt, sondern darin belassen und zusammen mit einem geeigneten Plasmid ligiert. Diese Methode eignete sich aber nur dann, wenn nicht zu viele verschiedene (max. 3-5) DNA-Fragmente nach der Spaltung mit einem Enzym (meist Sau 3AI oder Taq I) entstanden. Das "shot gun"-Klonieren hatte den Vorteil, daß nach einem einzigen Ligierungs- und Transformationsansatz mehrere DNA-Fragmente kloniert erhalten wurden.

II.12.1 Kompetenzinduktion von E. coli DH1/DH5α-Zellen

Kompetente Bakterien wurden mit einigen Modifikationen nach der Methode von HANAHAN (1985) hergestellt.

Mit einer Einzelkolonie des entsprechenden Bakterienstammes wurden 10 ml DH1-Medium angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{550} von 0,3 angezüchtet. 5 ml dieser Vorkultur wurden auf 100 ml mit bei 37°C vorgewärmtem DH1-Medium verdünnt und solange bei 37°C weiterinkubiert (ca. 3 h), bis eine OD_{550} von 0,48 erreicht worden war. Die Kultur wurde dann in einem Eisbad auf 0°C abgekühlt und in einem SORVALL GSA-Rotor abzentrifugiert (4°C, 6000 rpm, 5 min). Das Zellpellet wurde in eiskaltem Transformationspuffer I (TFB I) in 40 % des ursprünglichen Volumens resuspendiert, 5 min auf Eis gestellt, erneut abzentrifugiert und in 4 % des ursprünglichen Volumens in eiskaltem Transformationspuffer II (TFB II) aufgenommen. Nach einer 15minütigen Inkubation auf Eis wurden

Aliquots (100 und 200 µl) in auf -80°C vorgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße abgefüllt und sofort bei -80°C tiefgefroren. Die Zusammensetzung der Transformationspuffer war wie folgt:

TFB I:
30 mM Kaliumacetat
100 mM Rubidiumchlorid
10 mM Calciumchlorid
50 mM Manganchlorid
15 % Glycerin
mit 0,2 M Essigsäure ad pH 5,8; steril filtrieren.

TFB II:
10 mM Pipes
75 mM Calciumchlorid
10 mM Rubidiumchlorid
15 % Glycerin
mit HCl ad pH 6,5; steril filtrieren.

II.12.2 Vorbereiten des Vektors und Dephosphorylierung

In einem typischen Ansatz wurden 3 µg Vektor-DNA (meist pUC8, pUC9, pUC19) mit 30-60 U des entsprechenden Restriktionsenzyms gespalten und um eine Religierung des Vektors bei einfachem Enzymverdau zu verhindern, mit alkalischer Phosphatase (CIP) behandelt, die terminale 5'-Phosphatreste abspaltet. Dazu wurden zur Vektor-DNA nach der Enzymspaltung, aber noch im Spaltpuffer, 1/19 Volumen 20 x RAP-Puffer (s. B.II.9.2) und 1-2 U CIP hinzupipettiert und der Ansatz eine Stunde bei 37°C inkubiert. Inaktiviert wurde die CIP durch Zufügen von 1/9 Volumen 100 mM TNA und durch 45minütige Inkubation bei 65°C. Nach Phenolextraktion und Ethanolfällung wurde die DNA in einer Konzentration von ungefähr 0,2 µg/µl aufgenommen.

II.12.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

DNA-Fragmente wurden bis zu einer minimalen Größe von ca. 300 Bp aus Agarosegelen nach einem Protokoll der Firma SCHLEICHER & SCHÖLL isoliert. Dazu wurde DEAE-Ionenaustauschmembran verwendet, die, nachdem sie in $H_2O_{bid.}$ befeuchtet worden war, 1-3 mm hinter der gefärbten DNA-Bande in das Gel gesteckt wurde. Mit ca. 100-120 V wurde die Elektrophorese solange fortgesetzt, bis das gewünschte DNA-Fragment auf die Ionenaustauschmembran gewandert war. Dann wurde die Membran aus dem Gel herausgenommen, kurz mit $H_2O_{bid.}$ zur Gelrestentfernung gespült, und die DNA von der Membran durch 45minütige Inkubation bei 65°C in 300 µl "high-salt" NET-Puffer eluiert. Die Membran wurde einmal in 100 µl "high-salt" NET-Puffer nachgewaschen, beide Eluate vereint und die DNA mit 1 ml Ethanol gefällt.

"high-salt" NET-Puffer: 20 mM Tris/HCl, pH 8,0;
1 mM EDTA, pH 8,0; 1 M NaCl.

II.12.4 Ligierung und Transformation

Üblicherweise wurden Vektor und Insert in einem Verhältnis 1:1 (Einzelfragment) oder 10:1 ("shot-gun") in einem Ligierungsansatz (B.II.6.3) zusammengegeben und über Nacht bei 16°C inkukbiert. Zur Kontrolle wurde die gleiche Menge Vektor ohne DNA, deren Volumen durch $H_2O_{bid.}$ ersetzt worden war, ligiert. Zu 100 µl kompetenter DH1- bzw. DH5α-Zellen, die zuvor bei RT aufgetaut und auf Eis 10 min inkubiert worden waren, wurden 5 µl des Ligierungsansatzes gegeben, gut gemischt und 30-40 min auf Eis gestellt. Dann wurde der Ansatz 90 sec auf 42°C im Wasserbad erhitzt, 2 min auf Eis zurückgestellt und mit dem 4fachen Volumen DH1-Medium verdünnt. Nachdem der Transformationsansatz 45 min bei 37°C und leichtem Schütteln inkubiert worden wai, wurde ein Aliquot (i.a. 1/10 bis 1/5 des Volumens) auf einer DH1-amp-Platte (bzw. DH1-amp/X-Gal-Platte) ausplattiert. Dann wurden die Platten

bei 37°C über Nacht inkubiert und die Transformationseffizienz zum einen mit Hilfe der Kontrolligierung oder bei DH1-amp/X-Gal Platten (nur mit DH5α-Zellen) durch Abzählen blauer Kolonien abgeschätzt.

II.13 Isolierung von Plasmid-DNA

II.13.1 Minilyse

Zur schnellen Isolierung kleinerer Mengen Plasmid-DNA fanden, je nach Verwendungszweck der isolierten DNA, zwei unterschiedliche Methoden Verwendung:

Kochschnellaufschluß:

Um mehrere der nach **B.II.12.4** erhaltenen Klone möglichst schnell nach der Art der Plasmide zu untersuchen, wurden sie nach der Koch-Methode (HOLMES and QUIGLEY, 1981) aufgeschlossen:

5 ml eines DH1-Mediums, das das entsprechende Antibiotikum enthielt, wurde mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Die Zellen wurden bei 4°C in einer Tischzentrifuge bei 2500 rpm abzentrifugiert, in 400 µl STET-Puffer und 15 µl Lysozymlösung (20 mg/ml) resuspendiert, 5 min bei RT inkubiert und anschließend 1 min im kochenden Wasser denaturiert. Nachdem die Zellbestandteile bei 4°C und 12000 x g 10 min abzentrifugiert worden waren, wurde der Überstand mit einem Volumenteil Isopropanol 20 min bei -20°C gefällt. Ein Aliquot der nach Zentrifugation sedimentierten Plasmid-DNA wurde direkt in einem 1.2 %igen Agarosegel auf den Gehalt von Insertionen überprüft.

STET-Puffer: 8 % Saccharose; 5 % Triton X-100;
50 mM EDTA, pH 8,0; 50 mM Tris/HCl, pH 8,0.

Alkalische Extraktionsmetode:

Die alkalische Extraktionsmethode (BIRNBOIM and DOLY, 1979; HEINRICH, 1986) wurde angewendet, wenn Plasmid-DNA zur Sequenzierung isoliert werden sollte:

Die Zellen einer ÜNK wurden abzentrifugiert, einmal mit 2,5 ml eiskaltem TNE-Puffer gewaschen, erneut pelletiert, in 100 µl Lysozympuffer resuspendiert und 5 min bei RT lysiert. Zu der Zellsuspension wurden 200 µl frisch hergestellter Denaturierungspuffer (0,2 M NaOH, 1 % SDS) hinzupipettiert, sofort mit 150 µl 3 M Natriumacetat, pH 4,8 neutralisiert und 15 min auf Eis inkubiert. Zellreste und denaturierte Proteine wurden bei 4°C und 12000 x g abzentrifugiert und die Nukleinsäuren nach Phenolextraktion des Überstandes mit Ethanol (B.II.2.5) gefällt. Das Pellet wurde in 45 µl TE gelöst und die RNA mit 5 µl RNase (10 mg/ml) 15 min bei 37°C verdaut. Dann wurde der Ansatz zur Entfernung der Oligoribonukleotide mit 33 µl PEG/2,5 M NaCl versetzt und eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation bei 12000 x g (4°C und 20 min) wurde die reine Plasmid-DNA erhalten (HATTORI and SAKAKI, 1986). Ein Aliquot wurde auf ein 1,2 %iges Agarosegel aufgetragen und auf Reinheit und Unversehrtheit der DNA überprüft.

TNE-Puffer: 10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA.

Lysozympuffer: 5 mg/ml Lysozym; 50 mM Glucose;
50 mM Tris/HCl, pH 8,0.

II.13.2 Großansatz

Zur Isolierung größerer Mengen pUC-Plasmid-DNA wurden 0.5-1 l DH1 amp-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und bei 37°C über Nacht geschüttelt. Die Zellen wurden in einem SORVALL GSA-Rotor bei 9000 rpm, 10 min und bei 4°C abzentrifugiert, mit 60 ml TE-Puffer resuspendiert, erneut pelletiert und anschließend folgendermaßen lysiert (alle Angaben beziehen sich auf 1 l Bakterienkultur):

Das Pellet wurde in 20 ml Lysozymlösung (50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 10 mM EDTA, pH 8,0; 1 mg/ml Lysozym) aufgenommen und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde 40 ml Alkali-/SDS-Lösung (1 % SDS; 0,2 M NaOH) dazugegeben, vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Schließlich wurde 30 ml Kaliumacetat (3 M), pH 4,8, hinzupipettiert, die Suspension geschüttelt und 60 min auf Eis inkubiert.

Die lysierten Zellen wurden in einem SORVALL SS34-Rotor bei 17000 rpm 50 min lang bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand mit dem gleichen Volumenteil Isopropanol versetzt und die Nukleinsäuren bei -20°C präzipitiert. Durch Zentrifugation in einem SORVALL SS-34-Rotor (12000 rpm, 30 min, 4°C) wurde ein Pellet erhalten, das in 10 ml TE aufgenommen und mit 0,5 mg RNase 30 min bei 37°C und dann weitere 30 min mit 0,5 mg Proteinase K behandelt wurde. Nach Phenolbehandlung und Alkoholfällung wurde das vorgereinigte Nukleinsäuregemisch durch Cäsiumchloridgradientenzentrifugation in RNA, Supercoil Plasmid-DNA, open circle Plasmid-DNA und bakterienchromosomale DNA aufgetrennt:

Das Nukleinsäurepellet wurde in 4 ml H_2O gelöst, mit 4 mg CsCl und 170 µl Ethidiumbromid (20 mg/ml) versetzt und in einem SORVALL VT865-Vertikalrotor (47000 rpm, 16 h, 18°C) zentrifugiert. Mit einer Spritze wurde das Zentrifugenröhrchen seitlich punktiert und die Supercoil Plasmid-DNA-Bande abgezogen. Zur Entfernung des Ethidiumbromids wurde die DNA-Lösung ca. 6mal mit den gleichen Volumina wassergesättigten n-Butanols ausgeschüttelt. Dann wurde die wäßrige Phase zur Verdünnung der Cäsiumchloridkonzentration mit 2 Volumenteilen H_2O versetzt und die Plasmid-DNA mit Ethanol gefällt. Die Ausbeute an DNA betrug rund 1-2 mg (je nach Plasmid) pro 1 l Bakterienkultur.

II.14 Konstruktion von Deletionsmutanten mit Exonuklease III/VII

Zur Sequenzierung längerer DNA-Fragmente (≥ 700 Bp) empfahl sich die Konstruktion von gerichteten Deletionsmutanten nach der Methode von YANISH-PERRON et al. (1985):

5 µg der rekombinanten Plasmid-DNA (pUC19) wurden mit 50 U Kpn I 3 h geschnitten, um schützende 3'-überhängende DNA-Enden zu erzeugen. Die Vollständigkeit des Verdaus wurde in einem 1,2 %igen Agarosegel überprüft. Dann wurde die DNA zur Erzeugung von 5'-überhängenden - für Exonuklease III empfindliche - Enden weitere 3 h mit 50 U Bam HI nachgespalten. Nach Phenolextraktion und Ethanolfällung wurde die DNA in 50 µl Exonuklease III-Puffer (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT) aufgenommen und 5 min bei 37°C vorinkubiert. Nach Zugabe von 100 U Exonuklease III wurden jede Minute Aliquots von 2,5 µl entnommen, mit 5 µl H_2O versetzt und 10 min bei 70°C zur Inaktivierung des Enzyms inkubiert. Der überhängende DNA-Einzelstrang wurde mit Exonuklease VII 45 min bei 37°C nach folgendem Ansatz abgebaut:

7,5 µl Exo III-verdaute DNA
2 µl Exo VII-Puffer (10x: 500 mM Kaliumphosphat, pH 7,0; 80 mM EDTA; 10 mM DTT)
0,2 U Exo VII
H_2O ad 20 µl

Zur Inaktivierung des Enzyms wurde anschließend 15 min bei 70°C inkubiert. Um das Ausmaß der Einkürzung der Plasmid-DNA zu überprüfen, wurden von jeder zweiten Probe 8 µl entnommen und auf einem 1,2 %igen Agarosegel aufgetragen. Proben, deren Plasmid-DNA-Länge Unterschiede in Schritten von 200 Bp zeigte, wurden folgendermaßen weiterverarbeitet:

Die Ansätze wurden auf 20 µl mit H_2O aufgefüllt, mit 1,5 µl $MgCl_2$ (0,2 M), 1 µl dNTP-Mix (jedes dNTP 8 mM), 1 U DNA-Polymerase I (Klenow-Fragment) versetzt und 30 min bei RT inkubiert. Nach Phenolextraktion und Ethanolfällung wurde die linearisierte Plas-

mid-DNA in einem Ligierungsansatz (B.II.12.4) mit 2 U T4-DNA-Ligase über Nacht bei 16°C in die Ringform überführt. Nach Transformation in kompetente Zellen konnte die Effizienz berechnet werden: 10^3-10^4 Kolonien/Ligationsansatz.

Von Einzelkolonien wurden Schnellaufschlüsse (B.II.13.1) angesetzt und die Länge der eingekürzten Insertion durch vollständiges Herausschneiden des Inserts mit Eco RI und Pst I nach Agarosegelelektrophorese bestimmt.

II.15 Subklonierung in M13-Phagen

II.15.1 Subklonierung und Transformation

Die Klonierung von DNA-Fragmenten in M13-RF-DNA (MESSING, 1983) erfolgte ähnlich den in B.II.15 erwähnten Protokollen, nur die anschließnde Transformation fand nach der $CaCl_2$-Methode (MANDEL and HIGA, 1970) statt. Ein ausführliches Protokoll für die Transformation in den Stamm JM109 (YANISH-PERRON et al., 1985) ist in der Doktorarbeit von VOIT (1987) beschrieben.

II.15.2 Präparation von einzelsträngiger M13-Phagen-DNA

Da die M13-Phagen aus den Bakterien ausgeschleust werden, kann das einzelsträngige Genom der Phagen sehr einfach von den Bakterien isoliert werden. Dazu wurde 1 ml einer ÜNK von JM109-Zellen auf 100 ml mit 2 x TY-Medium verdünnt und davon je 1,5 ml mit einem M13-Phagenplaque angeimpft und bei 37°C 5 h unter Schütteln inkubiert. Die Bakterienzellen wurden 5 min bei 12000 x g pelletiert und der phagenhaltige Überstand mit 200 µl 20 % PEG 6000/2,5 M NaCl versetzt, gut geschüttelt und zur Präzipitation der Phagen 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurden die Phagen 10 min (12000 x g, 4°C) pelletiert, der Überstand abgenommen und das Pellet sehr sorgfältig von PEG-Resten gereinigt. Das Phagenpellet wurde in 100 µl TE aufgenommen und die Phagenhüllen durch Extrak-

tion mit Phenol, Phenol/Chloroform und Chloroform entfernt. Nach Ethanolfällung der wäßrigen Phase wurde das reine einzelsträngige DNA-Pellet in 20 µl H_2O aufgenommen. Die Ausbeute an sequenzierbarer DNA betrug 5-10 µg pro Ansatz.

II.16 DNA-Sequenzierungsmethoden

II.16.1 Sequenzierung in M13-Vektoren nach der Dideoxymethode

Die Hybridisierung von M13 Einzelstrang-DNA und 17mer Sequenzprimer (Annealing) fand in folgendem Ansatz statt:

1 pM M13-Universalprimer (2,5 ng/µl)
1,5 µl Klenow-Puffer (10x: 100 mM Tris/HCl, pH 8,0; 50 mM $MgCl_2$)
800 ng M13 ssDNA
H_2O ad 10 µl

Inkubiert wurde 50 min bei 56°C und dann nach B.II.16.2.1 sequenziert.

II.16.2 Plasmid-Sequenzierung nach der Dideoxymethode

Das Plasmid-Sequenzieren erfolgte nach der "supercoil-sequencing"-Methode (CHEN and SEEBURG, 1985; HEINRICH, 1986): Dazu mußte zuerst die ds-Plasmid-DNA in ssDNA überführt werden. Das Volumen von 2 µg Plasmid-DNA wurde zur Trockene gebracht und zur Denaturierung in 40 µl Denaturierungspuffer (0,2 M NaOH; 0,2 mM EDTA) gelöst. Nach 5minütiger Inkubation bei RT wurde mit 4 µl 2 M Ammoniumacetatlösung neutralisiert und mit Ethanol gefällt. Hybridisieren des Primers an die Plasmid ssDNA fand unter folgenden Bedingungen statt:

2 pM M13 Universal- oder Reverse-Primer (2,5 ng/µl)
1,5 µl Klenow-Puffer 10 x
2 µg Plasmid-ssDNA
H_2O ad 10 µl

Nach 15minütigem Annealing bei 56°C wurde wie bei B.II.16.2.1 die Sequenzierungreaktion durchgeführt.

II.16.2.1 Sequenzierungsreaktionen

Die Sequenzierungreaktion wurde mit einem Deoxy/Dideoxynukleotidgemisch (SANGER et al., 1977) durchgeführt. Dessen Zusammensetzung und ein entsprechendes Sequenzierungsprotokoll sind in der Doktorarbeit von VOIT (1987) beschrieben. Hier soll nur auf die für die T7-DNA-Polymerase abgeänderte Sequenzierungsanleitung genauer eingegangen werden.

II.16.2.2 Plasmid-Sequenzierung mit T7-DNA-Polymerase (Sequenase™) nach der Dideoxymethode

Im Laufe der Arbeit wurde die zur Sequenzierung nach der Dideoxymethode benötigte Klenow-Polymerase durch modifizierte T7-DNA-Polymerase = Sequenase™ (TABOR and RICHARDSON, 1987) ersetzt. Im folgenden wurde nach dem im Sequenase™-Kit enthaltenen Protokoll von USB CORPORATION vorgegangen.

Hier wird, im Gegensatz zum Sequenzieren mit dem Klenow-Enzym, in einer ersten Reaktion der Primer mit einer begrenzten Menge an Deoxynukleotiden ("labeling-reaction") - einschließlich dem ^{35}S radioaktiv-markiertem dATP - verlängert. Im zweiten Schritt, der Terminationsreaktion, in der Deoxy- und Dideoxynukleotide in einem bestimmten Mengenverhältnis zueinander eingesetzt werden, wird die DNA-Synthese in der wie bei SANGER (1977) beschriebenen Weise beendet.

Die Annealingreaktion wurde folgendermaßen durchgeführt: In ein Eppendorfreaktionsgefäß wurden folgende Komponenten pipettiert:

0,5 pM Primer
2 µl Sequenase™-Puffer (5 x: 200 mM Tris/HCl, pH 7,5; 100 mM $MgCl_2$; 250 mM NaCl)
2 µg denat. Plasmid-DNA
H_2O ad 10 µl.

Das Reaktionsgefäß wurde 2 min auf 65°C im Wasserbad erhitzt und die Annealingreaktion durch langsames Abkühlen auf RT innerhalb von 30 min durchgeführt.

Zu dem Annealing-Mix wurden

1 µl 0,1 M DTT
2 µl 1/5 verdünnter "Labeling-Mix" (5 x: 7,5 µM dGTP; 7,5 µM dCTP; 7,5 µM dTTP)
1 µl α-^{35}S-dATP (400 Ci/mM)
2 µl 1/8 mit TE, pH 7,5, verdünnte Sequenase™

hinzupipettiert und die "labeling reaction" 5 min bei RT durchgeführt. Die Deoxy/Dideoxynukleotidgemische hatten folgende Zusammensetzung:

80 µM dNTP; 8 µM ddNTP; 50 mM NaCl

Von jedem Terminationsgemisch wurden 2,5 µl in einem Eppendorfreaktionsgefäß auf 37°C 1 min vorgewärmt und dann aus dem "labeling reaction"-Gemisch jeweils 3,5 µl hinzupipettiert. Die Reaktion wurde 5 min bei 37°C durchgeführt und durch Zusetzen von 4 µl Stoppuffer (95 % Formamid; 20 mM EDTA; 0,05 % Bromphenolblau; 0.05 % Xylencyanol) abgestoppt. Bis zum Auftragen auf ein Sequenzgel wurden die Reaktionsgemische bei -20°C maximal eine Woche lang aufbewahrt.

II.16.3 Sequenzgele

Zum Auftrennen der Sequenzreaktionsprodukte fanden 6 % Polyacrylamidgele mit 7 M Harnstoff (0,1-0,4 mm Dicke) in TBE-Puffer Verwendung (BIGGIN et al., 1983). Dazu wurden die Gele zwischen einer frisch silikonisierten Thermostatisierplatte und einer frisch mit "Bind-Silan" behandelten Ohrenplatte (45 cm) gegossen (GAROFF and ANSORGE, 1981). Das Gel konnte 2-20 h auspolymerisieren und wurde dann in einer LKB MACROMOULD Apparatur 20-30 min bei 20-25 mA einer Vorelektrophorese unterworfen.

Ein Aliquot, üblicherweise 2,5 µl, der Sequenzierungsprobe wurde 3 min bei 95°C denaturiert und mit Mikrokapillaren unter Verwendung von "Haifischzahn"-Kämmen aufgetragen. Im allgemeinen lief die Elektrophorese bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA und einer Temperatur von 55°C, bis die Bromphenolblaubande das untere Gelende erreicht hatte. Nach Trennung der Thermostatisierplatte von der Ausschnittplatte wurde das an der letzteren Platte gebundene Gel 10-20 min in 10 % Essigsäure fixiert, 4 h bei 80°C getrocknet und 16-48 h autoradiographiert.

C ERGEBNISSE

I Etablierung genomischer Genbanken in λ-EMBL3

Die Analyse längerer DNA-Bereiche erfordert die Klonierung überlappender DNA-Sequenzen. Ein prinzipieller Weg, mit dem diese Bedingung erfüllt wird, ist die Etablierung genomischer Genbanken aus partiell verdauter genomischer DNA im λ-Phagensystem (FRISCHAUF, 1987). Das Ausgangsmaterial, die genomische DNA, sollte eine Mindestlänge von 100-200 kBp haben (HERRMANN and FRISCHAUF, 1987). Als Vektor wurde der Phage λ-EMBL3 aus den bei B.II.6 genannten Gründen gewählt. Bei diesem Phagentyp kann das 13 kBp große Mittelstück durch DNA-Fragmente im Größenbereich von 9-22 kBp ersetzt werden.

Die Spaltbedingungen für die hochmolekulare, genomische DNA, deren Länge und Integrität zuvor in einem 0,5 %igem Agarosegel mit λ-DNA als Marker überprüft worden war, wurden gemäß B.II.6.2 ermittelt: 10 µg DNA wurden mit 0,5 U des Enzyms Sau 3AI gespalten, das zuvor mit 1 x Spaltpuffer auf 0,125 U/µl verdünnt worden war, um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Alle 10 min wurde aus dem Reaktionsansatz 1 µg DNA entnommen, mit 2 µl 0,5 M EDTA versetzt und bis zur Analyse mittels Gelelektrophorese auf Eis gestellt. Die Spaltzeit, in der die meisten Fragmente zwischen 12 und 22 kBp vorlagen, wurde zu 20 min ermittelt (Abb. 1).

Im Großansatz wurden 400 µg genomische DNA mit je 0,05 U Sau 3AI pro µg DNA wie unter B.II.6.2 gespalten. Die DNA-Fragmente wurden durch CsCl-Gradientenzentrifugation (Rotor SW 41; 20000 rpm; 20 h) aufgetrennt und der Gradient in Fraktionen von 0,5 ml aufgeteilt. Diejenigen Fraktionen, die am meisten DNA zwischen 12 und 22 kBp enthielten (s. Abb. 2), wurden vereinigt und die DNA, nach Verdünnung mit H_2O, mit Ethanol gefällt.

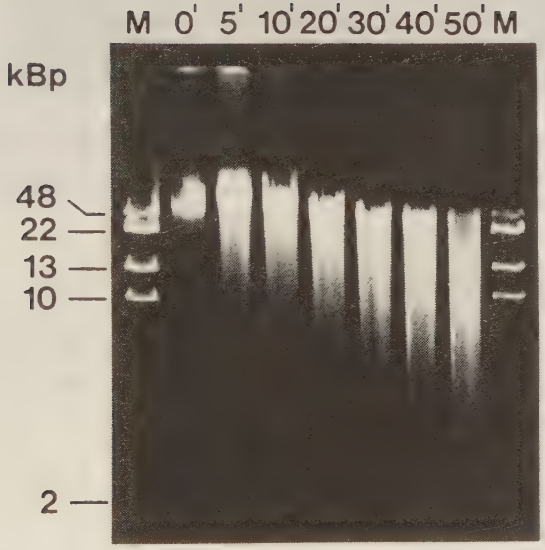


Abb. 1: Kinetik zur Ermittelung der optimalen Spaltzeit genomischer Eurypelma-DNA mit Sau 3AI.
M = Bgl II verdaute λ-DNA und unverdaute λ-DNA als Längenstandard; 0' = 0,5 µg ungespaltene Eury-DNA;
0,8 % Agarosegel; Laufzeit 4 h bei 50 V.

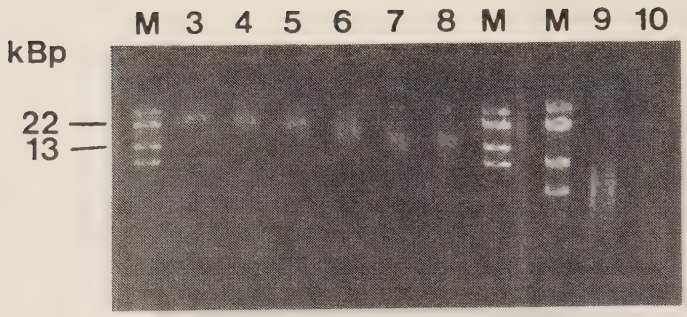


Abb. 2: Fraktionen der Sau 3AI partiell verdauten Eurypelma-DNA nach CsCl-Gradientenzentrifugation.
M = Bgl II verdaute λ-DNA und unverdaute λ-DNA als Längenstandard.

Die Ausbeute an klonierbarer DNA betrug ca. 10 µg, die letztlich noch mit 4 U Phosphatase zur Abspaltung 5'-terminaler Phosphatreste behandelt wurden. Der Erfolg der Phosphatasebehandlung wurde mit 0,5 µg DNA nach Ligierung mit T4-DNA Ligase durch Gelelektrophorese überprüft (Abb. 3).

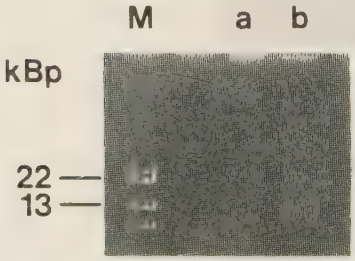


Abb. 3: Kontrolle der Phosphatasebehandllung nach Ligasereaktion; sonst wie bei Abb. 1.
a) Ligation vor
b) Ligation nach Phosphatasebehandlung genomischer DNA.

Anschließend wurden 2,5 µg DNA-Fragmente mit 5 µg Eco RI und Bam HI geschnittener Vektor-DNA 16 h bei 16°C ligiert. Die Effizienz der Ligierung sowie der Kontrolligierung (nur der geschnittene Vektor) wurde ebenfalls durch Gelelektrophorese überprüft (Abb. 4).

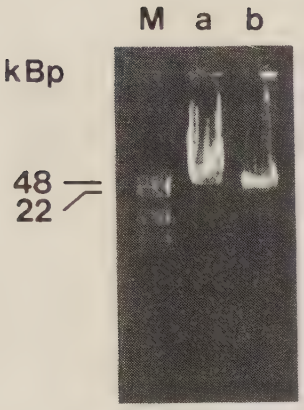


Abb. 4: Kontrolle der Ligasereaktion von
a) Vektor λ-EMBL3 mit vorbehandelter genomischer DNA.
b) Vektor λ-EMBL3.

Die Ligaseansätze wurden zu 1,5 µl Aliquots verpackt (B.II.4.6.3) und der Titer der Phagensuspension von 10 µl je Verpackungsansatz bestimmt. Insgesamt konnten 5 Genbanken (jede Genbank stammt von einem einzigen Tier) mit zusammen 4,3 x 10^6 pfu etabliert werden. Nach Amplifikation der einzelnen Genbanken betrug der Titer durchschnittlich 10^8 pfu/ml.

II Screening der Genbank Eury IV mit dem pHC4e-Klon

Die umfangreichste Genbank (Eury IV) mit ca. 1,7 x 10^6 Ausgangsphagen wurde ausgewählt, um nach Hämocyaningenen zu suchen. Als Hybridisierungssonde stand der vollständig sequenzierte cDNA-Klon der Hc UEe (pHC4e) VOIT (1986) zur Verfügung. 30 BBL-Platten mit je ca. 20000 pfu wurden mit dem nach der Nick-Translationsmethode (RIGBY et al., 1977) radioaktiv markierten cDNA-Klon pHC4e durchmustert (BENTON and DAVIS, 1977). Dabei leuchteten 20 Signale an identischen Positionen auf den Doppelfiltern auf. Nach Plaquereinigung konnten 15 positive Klone selektiert werden, die in der Reihenfolge ihrer Entdeckung Hc 1 bis Hc 15 benannt wurden.

II.1 Physikalische Kartierung der Klone Hc 1 bis Hc 15

Nach Phagenschnellaufschluß wurden die 15 positiven Klone mit Hilfe kombinierten Restriktionsenzymverdaus sowie Southern-Transfers der DNA-Banden und anschließender Hybridisierung mit dem radioaktiv oder biotin markierten pHC4e-Klon charakterisiert. Folgende Klone zeigten ein identisches Spaltmuster:

Hc 1 und Hc 5;
Hc 2, Hc 3, Hc 7 und Hc 8;
Hc 4, Hc 13 und Hc 14;
Hc 6 und Hc 9.

Im folgenden werden deshalb nur die zuerst gefundenen Klone erwähnt, also Hc 1, Hc 2, Hc 4 und Hc 6. Auf den nächsten Seiten werden die Abbildungen der Restriktionsmuster, die nach Southern-Transfer und Hybridisierung mit dem pHC4e-Klon aufleuchtenden Banden und die physikalischen Karten der Klone Hc 1 bis Hc 15 gezeigt (Abb. 5 - Abb. 12). Mehr als zwei hintereinanderfolgende Eco RI- oder Hind III-Schnittstellen wurden entweder durch partiellen Verdau der DNA der entsprechenden Klone (Hc 1, Hc 2 und Hc 6) oder durch Unterklonierung der betreffenden Regionen kartiert. Im Anhang sind die Längen der einzelnen Restriktionsfragmente tabellarisch aufgelistet.

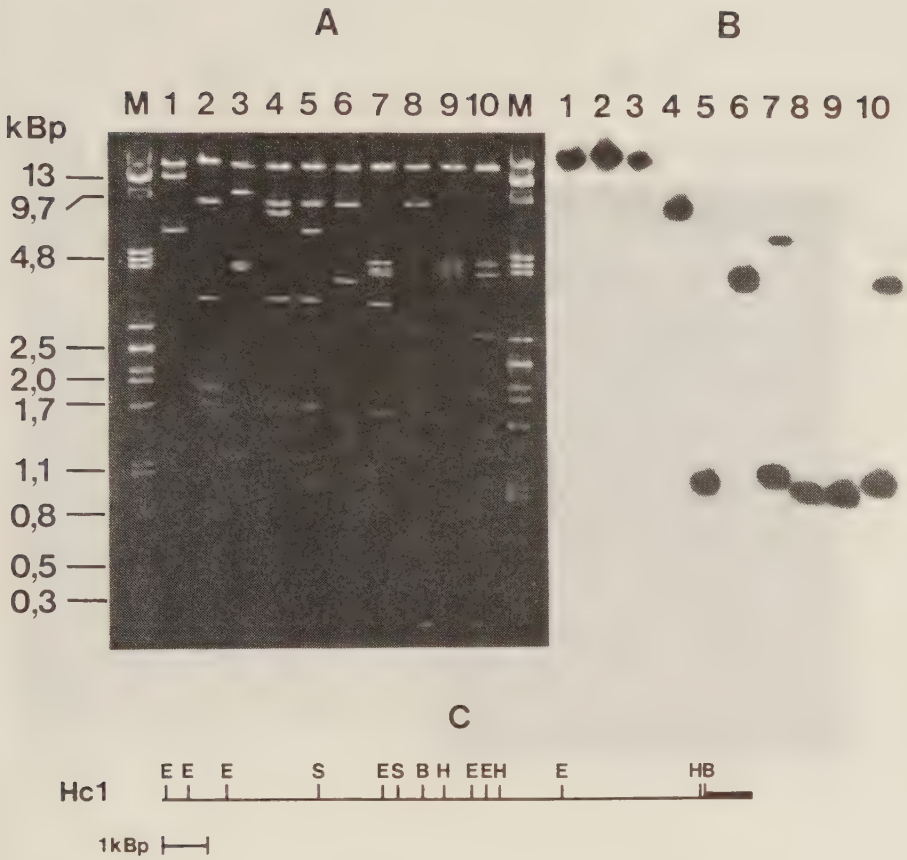
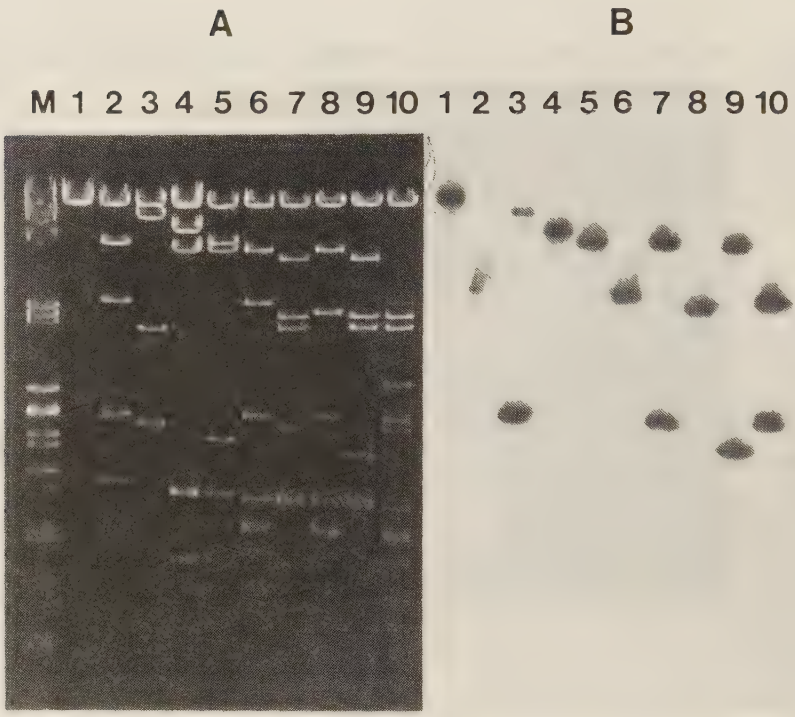


Abb. 5: A: Klon Hc 1, 1 % Agarosegelelektrophorese nach kombinierter Restriktionsenzymanalyse; DNA gefärbt mit Ethidiumbromid; Spur M: Markergemisch aus λ-DNA, die getrennt mit Pst I und Bgl II verdaut wurde;
Spur 1: DNA, Bam HI verdaut; Spur 2: DNA, Eco RI verdaut; Spur 3: DNA, Hind III verdaut; Spur 4: DNA, Sal I verdaut; Spur 5: DNA, B/S verdaut; Spur 6: DNA, E/S verdaut; Spur 7: DNA, H/S verdaut; Spur 8: DNA, B/E/S verdaut; Spur 9: DNA, B/H/S verdaut; Spur 10: DNA, E/H/S verdaut.

B: Klon Hc 1, nach Southern-Transfer der DNA-Banden wie bei A auf Nitrozellulose und anschließender Hybridisierung mit α-^{32}P radioaktiv markiertem cDNA Klon der Hc UEe; Exp.: 12 h.

C: Restriktionskarte der Insertion;
---▬▬---- mit pHC4e-Klon hybridisierender Bereich;
B = Bam HI, E = Eco RI, H = Hind III, S = Sal I.



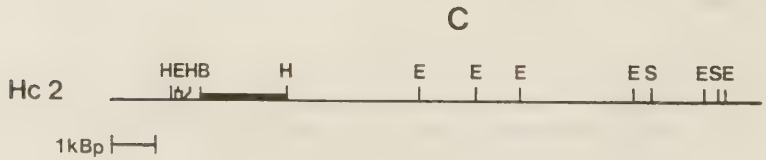
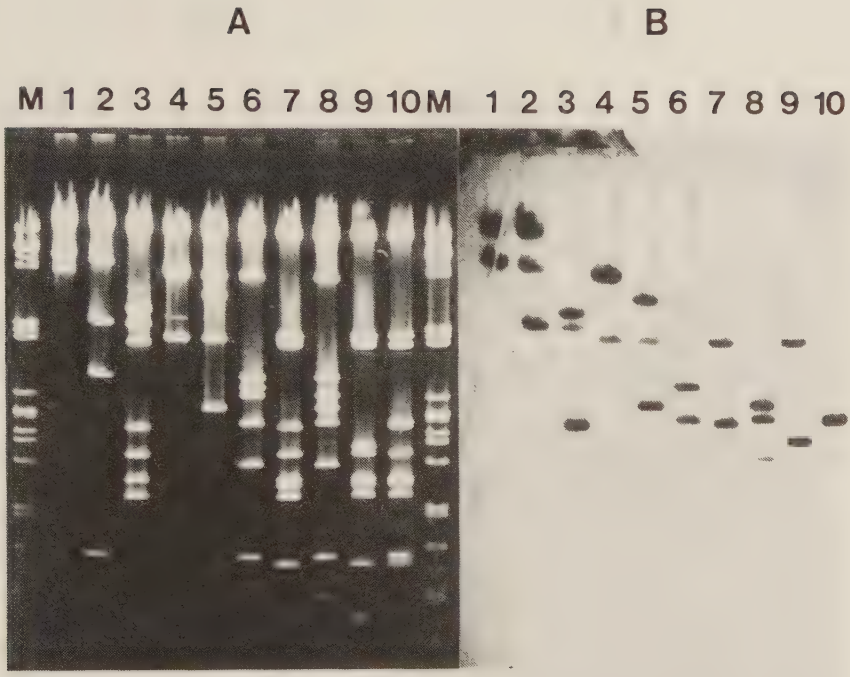


Abb. 6: A: Klon Hc 2, sonst wie bei Abb. 5A.
B: Klon Hc 2, nach Southern-Transfer der DNA-Banden wie bei A; anschließend wie bei Abb. 5B.
C: Klon Hc 2, Restriktionskarte der Insertion; sonst wie bei Abb. 5C.



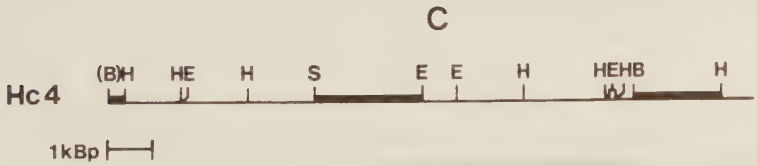
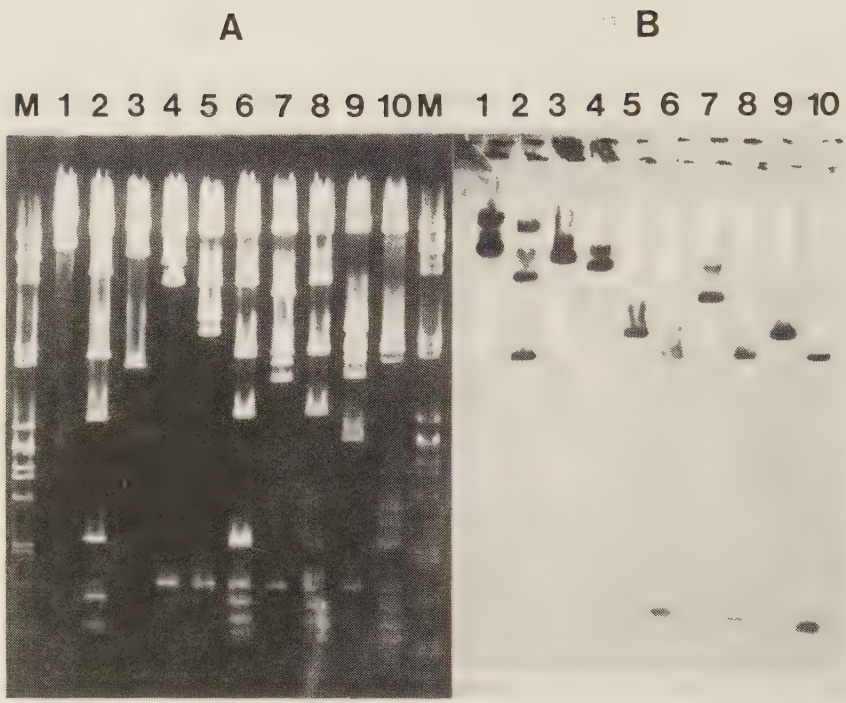


Abb. 7: A: Klon Hc 4, sonst wie bei Abb. 5A.
B: Klon Hc 4, nach Southern-Transfer der DNA-Banden wie bei A und anschließender Hybridisierung mit bio-11-dUTP-markiertem cDNA Klon der Hc UEe.
C: Klon Hc 4, Restriktionskarte der Insertion; sonst wie bei Abb. 5C; [(B) ist eine regenerierte Bam HI-Schnittstelle, siehe dazu Abb. 13].



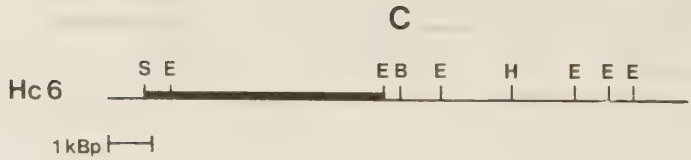


Abb. 8: A: Klon Hc 6, sonst wie bei Abb. 5A.
B: Klon Hc 6, sonst wie bei Abb, 7B.
C: Klon Hc 6, Restriktionskarte der Insertion; sonst wie bei Abb. 5C.

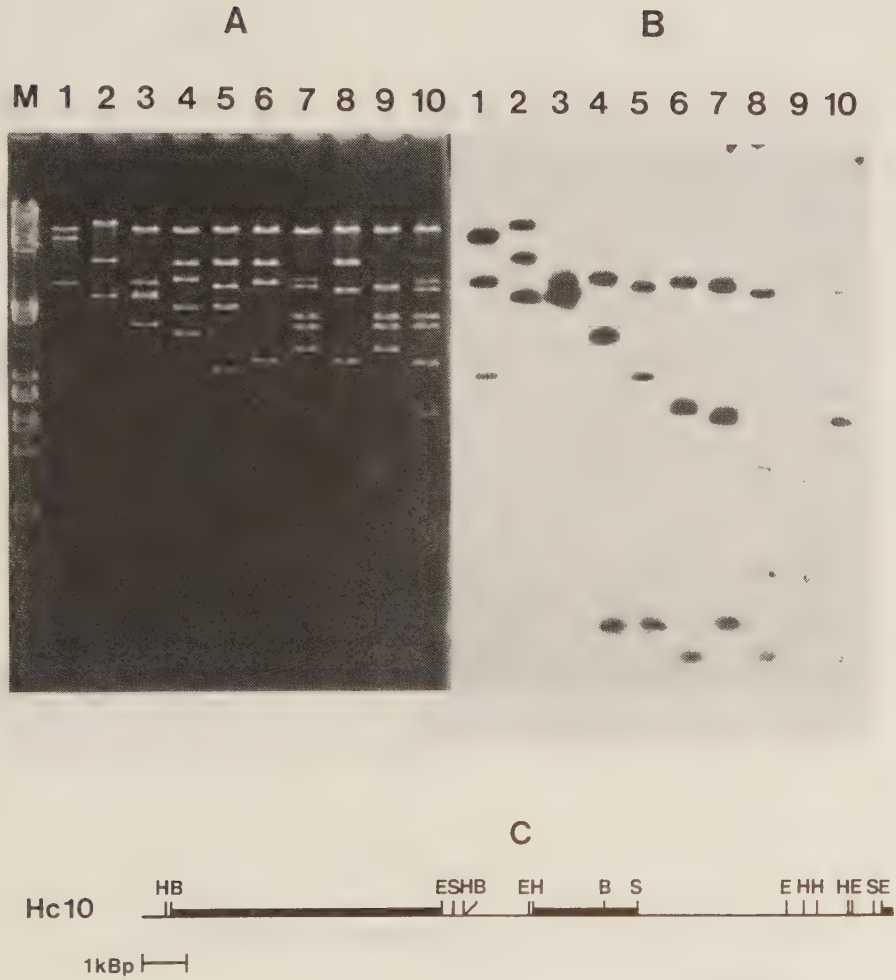
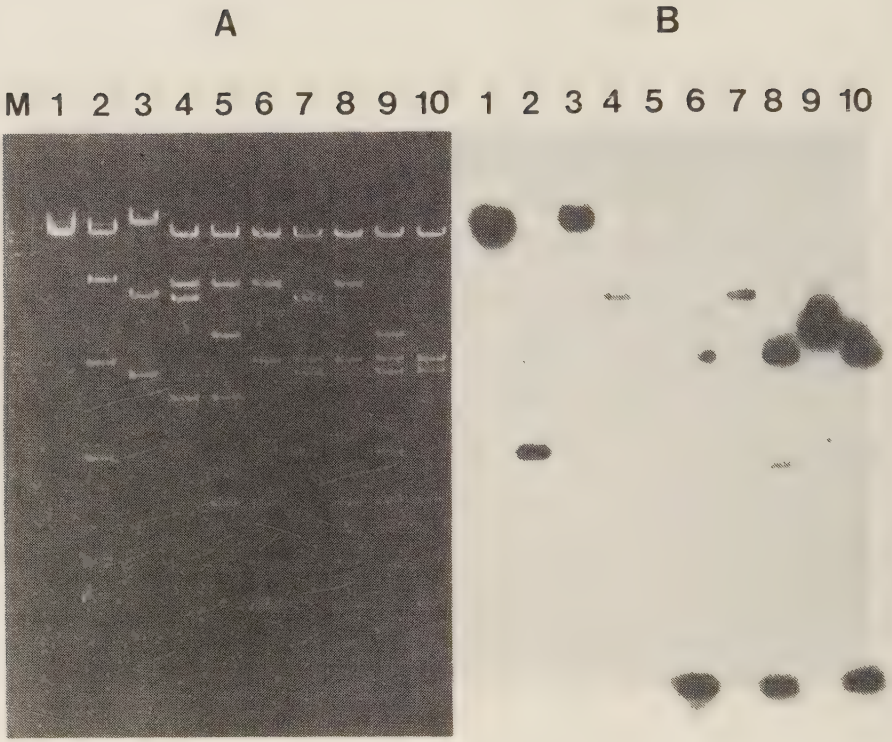


Abb. 9: A: Klon Hc 10, sonst wie bei Abb. 5A.
B: Klon Hc 10, sonst wie bei Abb. 5B.
C: Klon Hc 10, Restriktionskarte der Insertion; sonst wie bei Abb. 5C.



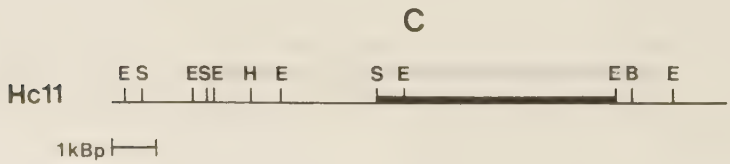


Abb. 10: A: KLon Hc 11, sonst wie bei Abb. 5A.
B: Klon Hc 11, sonst wie bei Abb. 5B.
C: KLon Hc 11, Restriktionskarte der Insertion; sonst wie bei Abb. 5C.

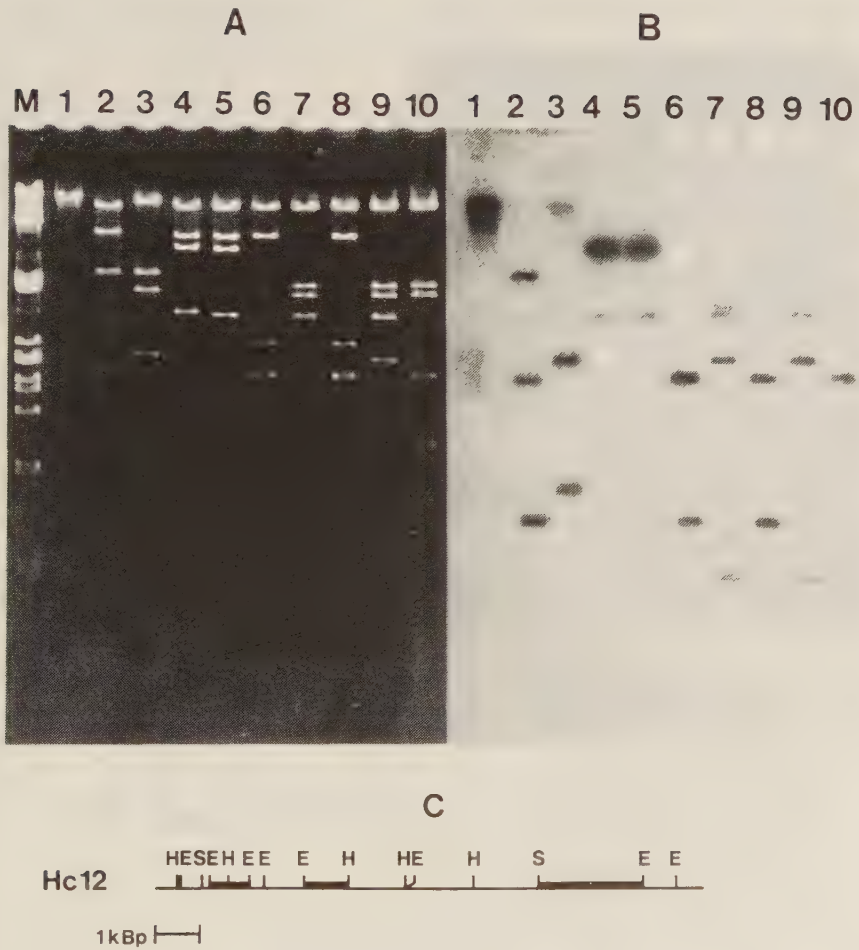
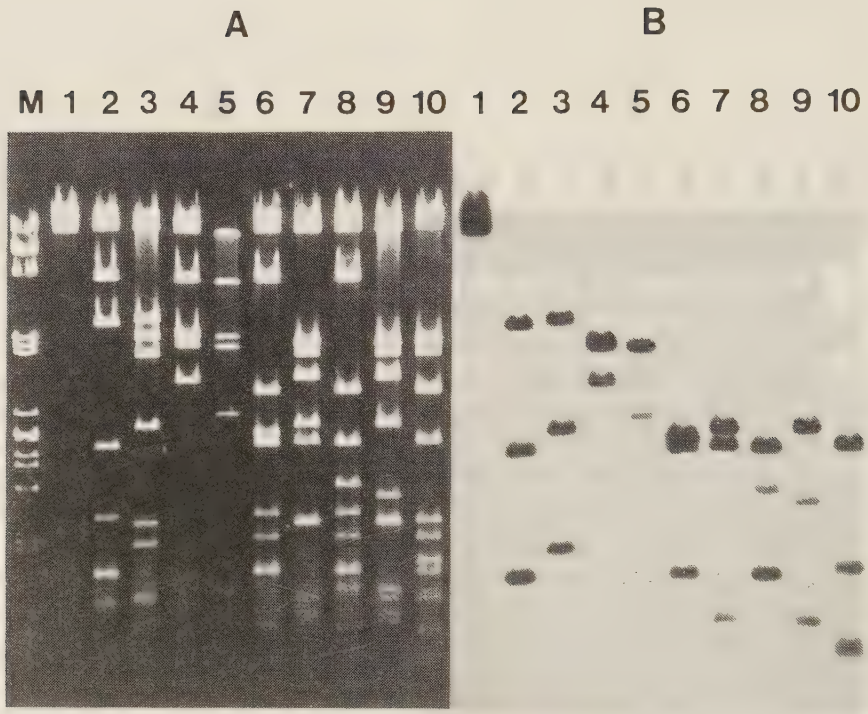


Abb. 11: A: Klon Hc 12, sonst wie bei Abb. 5A.
B: Klon Hc 12, sonst wie bei Abb. 5B.
C: Klon Hc 12, Restriktionskarte der Insertion, sonst wie bei Abb. 5C.



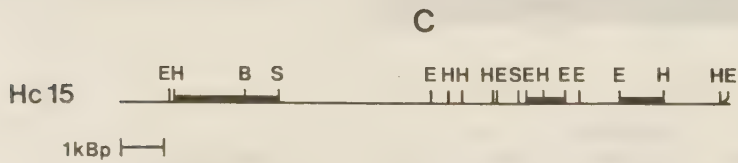


Abb. 12: A: Klon Hc 15, sonst wie bei Abb. 5A.
B: Klon Hc 15, sonst wie bei Abb. 5B.
C: KLon Hc 15, Restriktionskarte der Insertion; sonst wie bei Abb. 5C.

Durch Überlappungen der Restriktionsmuster konnten alle 8 Hc-Klone einander zugeordnet werden, so daß eine zusammenhängende physkalische Karte über einen rund 70 kBp großen Bereich erstellt werden konnte (Abb. 13).

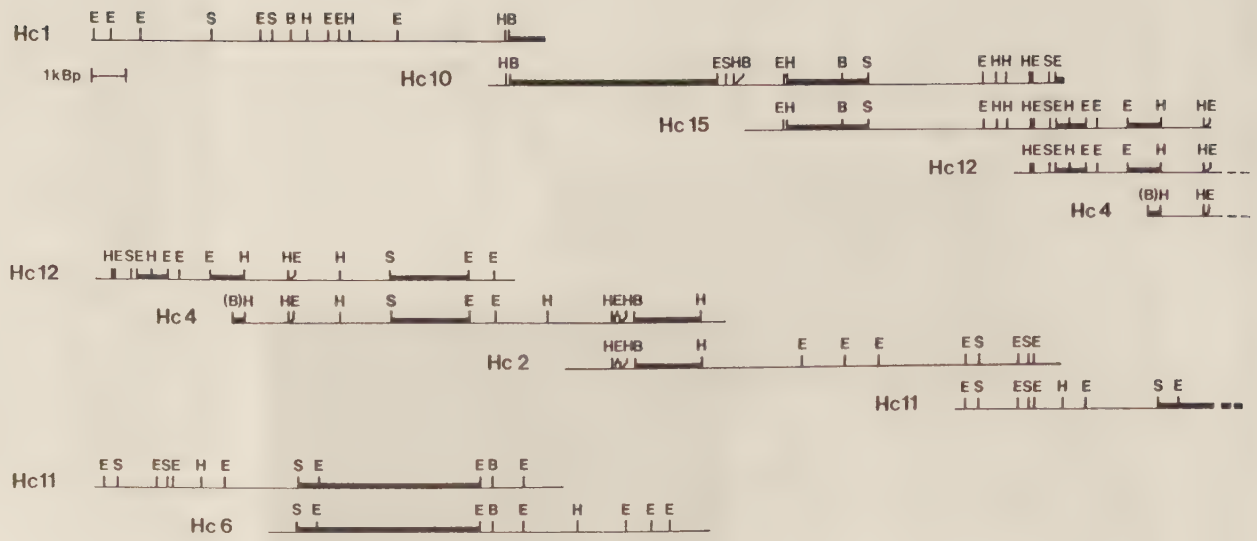


Abb. 13: Vergleichender Überblick der isolierten Phagen.
---▬--- mit pHC4e-Klon hybridisierender Bereich.

II.2 Hybridisierung der Hc-Klone Hc 1-Hc 15 mit "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe

Um den Ausgangspunkt für die nähere Charakterisierung (d.h. letztendlich Sequenzierung) der hybridisierenden Bereiche festzulegen, wurde die DNA der Klone Hc 1-Hc 15 mit einer Oligonukleotidprobe, die für das "Kupfer A"-Zentrum codiert (VOIT and SCHNEIDER, 1986; VOIT, 1987), hybridisiert. Nur ein 1,6 kBp langes Bam HI/Hind III-Fragment, das sowohl auf Klon Hc 10 als auch auf Klon Hc 15 kartiert (Abb. 14 und 15), leuchtet nach Hybridisierung mit der Oligonukleotidprobe auf.

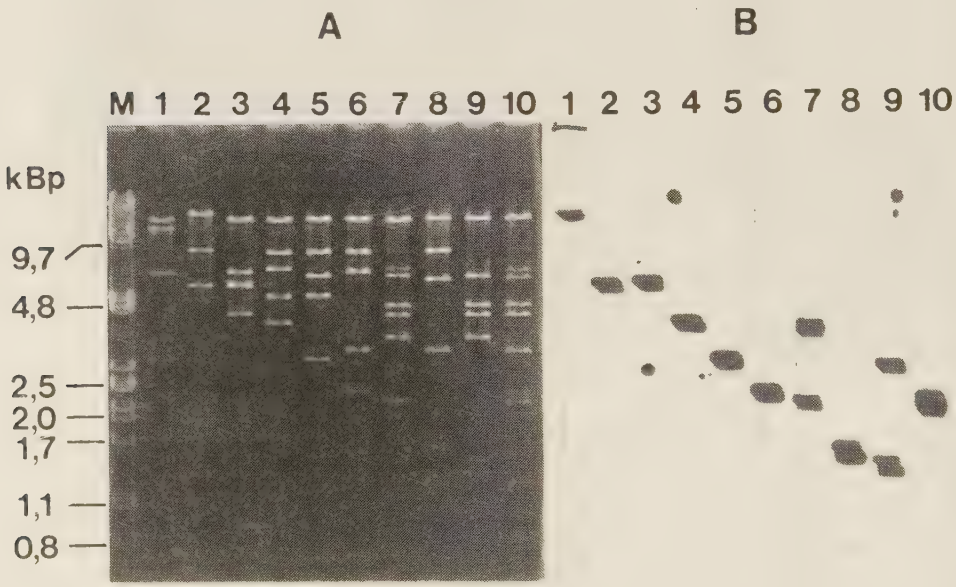


Abb. 14: A: Klon Hc 10, kombinierte Restriktionsenzymspaltung wie bei Abb. 9A.
B: Klon Hc 10, nach Southern-Transfer der DNA-Banden wie bei A und anschließender Hybridisierung mit γ-^{32}P markierten "Kupfer A"-Oligonukleotiden; Hybridisierungstemp.: 37°C; Waschen: 3 min. bei 50°C in 6 x SSC, 0,1 % SDS; Exp.: 20 h.

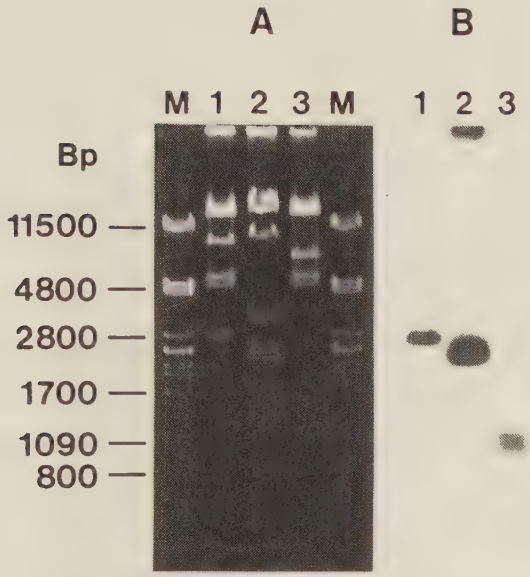


Abb. 15: **A:** Klon Hc 15, 1 % Agarosegelelektrophorese, Färbung der DNA mit Ethidiumbromid;
Spur M: λ-Pst I Marker; Spur 1: Hc 15-DNA, geschnitten mit Sal I; Spur 2: Hc 15-DNA, geschnitten mit Eco RI/Sal I; Spur 3: Hc 15-DNA, geschnitten mit Bgl II/ Sal I.
B: Klon Hc 15, nach Southern-Transfer der DNA-Banden wie bei **A** auf Nitrozellulose;
sonst wie bei Abb. **14B**; Bg = Bgl II.

Da der gesamte pHC4e-Klon darüberhinaus mit einem Bam HI/Sal I 0,8 kBp-Fragment hybridisiert (s. Abb. 9 und 13), entspricht die genomische Bam HI-Schnittstelle derjenigen auf dem pHC4e-Klon (Abb. 16).

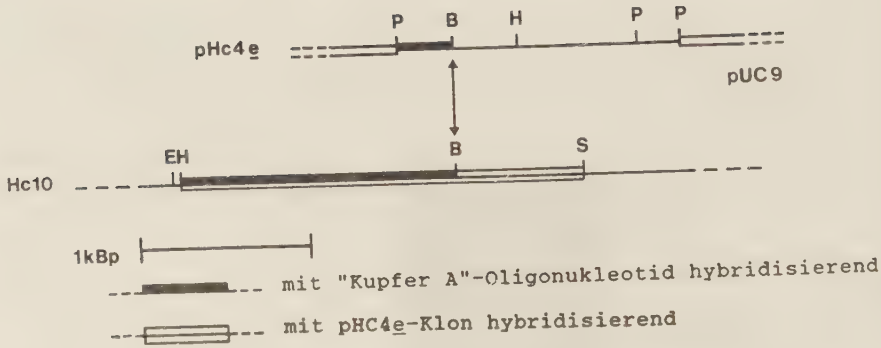


Abb. 16: Vergleich der Restriktionsmuster von pHC4e (mit "Kupfer A"-Oligonukleotid hybridisierndem Fragment P-B) mit Ausschnitt aus der Restriktionskarte von Hc 10.

Mit der Festlegung eines Exonbereichs, der für die "Kupfer A"-Bindungsstelle codiert, wurde ein Fixpunkt für die Orientierung sowie Unterklonierung und Sequenzierung aller mit dem pHC4e-Klon hybridisierenden Bereiche gefunden.

III Unterklonierung und Sequenzierung der mit dem pHC 4e-Klon hybridisierenden Bereiche

III.1 Charakterisierung des Klons Hc 10

III.1.1 Charakterisierung des UK Hc 10S4,1

Zur näheren Analyse des mit dem "Kupfer A"-Oligonukleotid hybridisierenden Bereichs wurde aus dem Klon Hc 10 der Abschnitt zwischen den beiden Sal I-Schnittstellen (s. Abb. 13), ein 4,1 kBp großes Fragment, in pUC8 unterkloniert und zusätzlich zu den "üblichen" Enzymen Bam HI, Eco RI, Hind III und Sal I mit Xba I und Bgl II restringiert (Abb. 17 und 18).

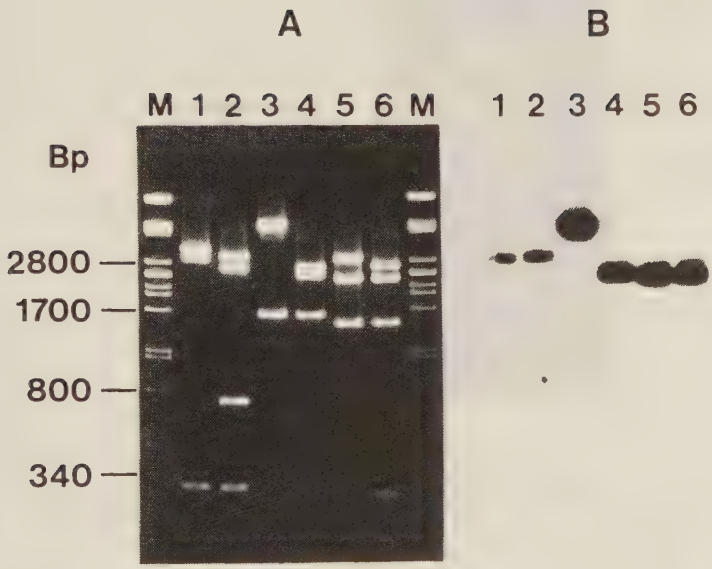


Abb. 17: A: UK Hc 10S4,1, Plasmid-DNA, geschnitten mit Bam HI (Spur 1), Bgl II (Spur 2), Eco RI (Spur 3), Eco RI/Sal I (Spur 4), Hind III (Spur 5) und Hind III/Sal I (Spur 6); Auftrennung der DNA-Fragmente im 1,5 % Agarosegel; DNA gefärbt mit Etbr.; sonst wie bei Abb. 15A.

B: UK Hc 10S4,1, nach Southern-Transfer der DNA-Banden wie bei A und anschließender Hybridisierung mit γ-^{32}P markiertem "Kupfer A"-Oligonukleotid; Hybridisierung und Waschen wie bei Abb. 14B; Exp.: 14 h.

Durch Verdau der DNA des UK Hc10S4,1 mit Bam HI und Bgl II einerseits sowie andererseits mit Bam HI und Xba I wurden Fragmente erhalten, die nach Unterklonierung in pUC8 sowie pUC19 direkt sequenziert wurden (Abb. 19).

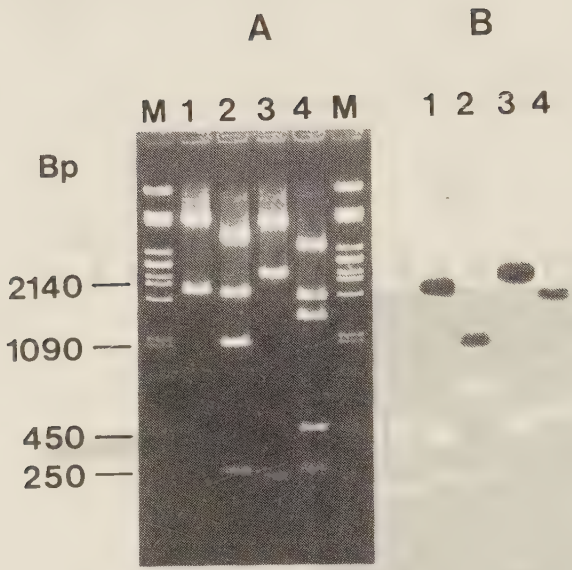


Abb. 18: A: UK Hc 10S4,1, Plasmid-DNA, geschnitten mit Bgl II/ Pst I (Spur 1), Bgl II/Bam HI (Spur 2), Xba I/Pst I (Spur 3) und Xba I/Bam HI (Spur 4); sonst wie bei Abb. 17A.
B: UK Hc 10S4,1, nach Southern-Transfer der DNA-Banden wie bei A; sonst wie bei Abb. 17B.

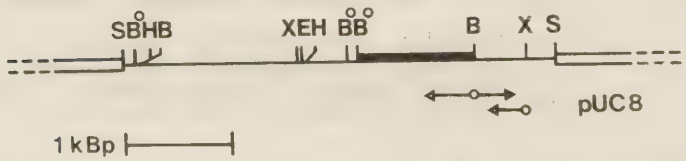


Abb. 19: Restriktionskarte des UK Hc 10S4,1.
---▬--- mit "Kupfer A"-Oligonukleotidprobe hybridisierender Bereich; Pfeile geben Sequenzierrichtung und Länge an; B° = Bgl II, X = Xba I.

Wie aus den sequenzierten Abschnitten (s. C.V, Abb. 54) ersichtlich ist, besteht vollständige Übereinstimmung mit den entsprechenden Teilsequenzen des pHC4e-Klons. Dieses erste gefundene Exon codiert für einen Bereich der Hc UEe, auf dem das "Kupfer A"-Bindungszentrum mit den drei beteiligten Histidinresten liegt. Die Intron-Exon und Exon-Intron-Übergänge sind durch die Sequenzen ag/GA und AG/gt definiert und entsprechen damit dem typischen Bild der Exon-Intron-Exon-Grenzen [(BREATHNACH and CHAMBON, 1982; MOUNT, 1982); s.a. D.IV.2].

III.1.2 Charakterisierung des UK Hc10X/S3,2

Nach Sequenzierung des Exons auf Klon Hc 10S4,1 war die Orientierung aller weiteren mit dem pHC4e-Klon hybridisierenden Exon-Abschnitte festgelegt. In Richtung Aminoterminus der UEe lag auf Klon Hc 10 - sowie teilweise überlappend auf Hc 1 - ein ca. 6 kBp langer Abschnitt, der mit dem pHC4e-Klon hybridisierte. Mit der Einschränkung, daß dem pHC4e-Klon in aminoterminaler Richtung die Codons für 73 AS fehlen, bestand die Hoffnung, in diesem Bereich alle weiteren codierenden Regionen mit anschließender 5'-untranslatierter Region zu finden.

Da ein 6 kBp langes DNA-Fragment relativ schwer in pUC-Plasmide zu klonieren ist, wurde zuerst nach weiteren Restriktionsenzymen gesucht, die in diesem Abschnitt Erkennungssequenzen besitzen. Mit Xba I wurde ein Enzym gefunden, das zweimal in diesem Bereich schneidet (s. Abb. 20).

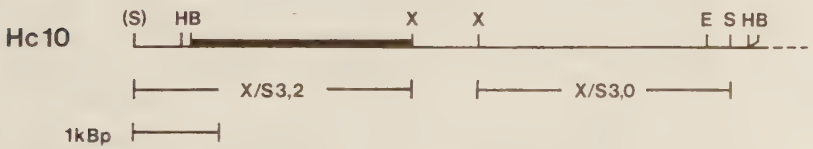


Abb. 20: Linker Endabschnitt der Insertion im Phagen Hc 10.
_▬▬_ mit pHC4e-Klon hybridisierender Bereich;
(S) = Sal I-Schnittstelle des Phagen λ-EMBL3.

Nach Unterklonierung des linken Xba I/Sal I3,2 kBp und des rechten Xba I/Sal I 3,0 kBp-Fragmentes in pUC19 und nach näherer Charakterisierung mit den Enzymen Pst I und Hinc II, stellte sich heraus, daß nur der linke 3,2 kBp-Klon mit dem 1400 Bp Pst I-Fragment des pHC4e-Klons hybridisierte (Abb. 20 und 21).

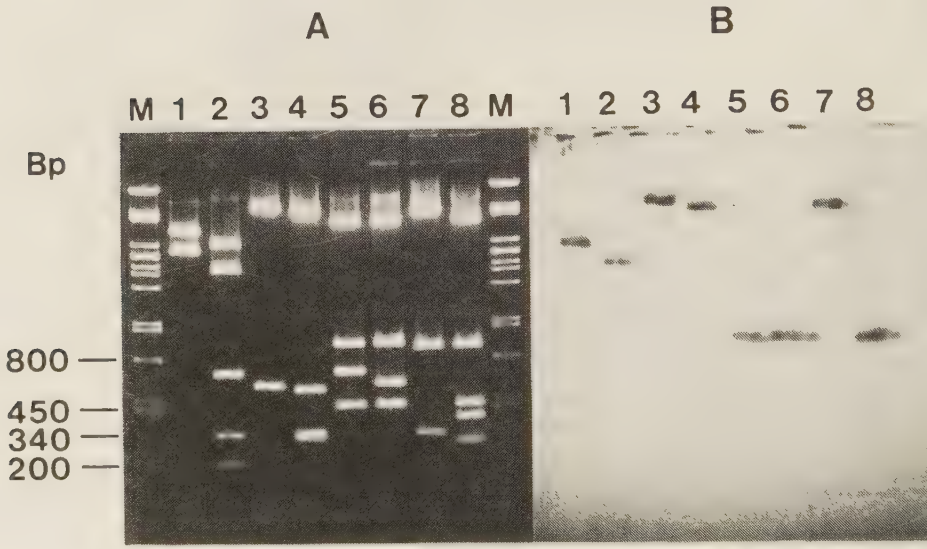


Abb. 21: A: UK Hc 10X/S3,2, Plasmid-DNA, geschnitten mit Bam HI (Spur 1), Bam HI/Pst I (Spur 2), Hind III (Spur 3), Hind III/Pst I (Spur 4), Hinc II (Spur 5), Hinc II/Hind III (Spur 6), Pst I (Spur 7) und Hinc II/Pst I (Spur 8);
sonst wie bei Abb. 17A.
B: UK Hc 10X/S3,2, nach Southern-Transfer der DNA-Banden wie bei A und anschließender Hybridisierung mit bio-11-dUTP markiertem 1400 Bp Pst I-Fragment des pHC4e-Klons; Hybridisierungs- und Waschtemperaturen wie bei B.II.14.5 angegeben.

Da das Hinc II/Pst I 0,9 kBp große Fragment, auf dem das Exon liegt, nicht restlos mit Überlappungen sequenziert werden konnte (s. Abb. 22), wurde dieses DNA-Fragment mit dem oft schneidenden Enzym Sau 3AI verdaut und die entstehenden Bruchstücke nach der "shot gun"-cloning Methode (s. B.II.12) unterkloniert.

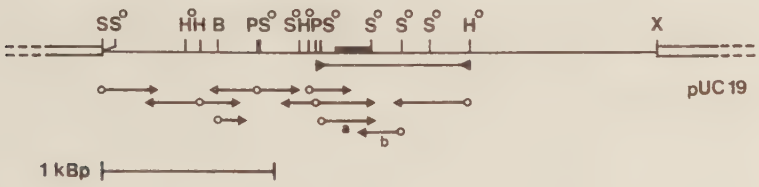


Abb. 22: Restriktionskarte des UK Hc 10X/S3,2.
Bereich, der nach Abb. 21 mit dem 1400 Bp Pst I-Fragment des pHC4e-Klons hybridisierte;
gibt Größe des Exons wieder; Pfeile geben Sequenzierrichtung und Länge an; a und b: Sequenzen des Sau 3AI-Unterklons von Hinc II/Pst I0,9;
H° = Hinc II; S° = Sau 3AI; S°-Schnittstellen nach Sequenzierung bestimmt;
Sal I-Schnittstelle stammt von λ-EMBL3.

Es konnte glücklicherweise ein durch partiellen Verdau entstandenes 0,5 kBp großes Sau 3AI-Fragment kloniert werden, das nach beidseitigem Sequenzieren (a und b) die Lücke im Hinc II/Pst I 0,9 kBp-Fragment schloß. Somit wurde ein Exon (s. C.V, Abb. 53) in aminoterminaler Richtung vom "Kupfer A"-Bindungszentrum gesehen genau festgelegt. Das vermutlich erste Exon für die UEe sollte auf Klon Hc 1 zu liegen kommen, da bis zum linken Ende der Insertion im Phagen Hc 10 sequenziert wurde(s.a. C.IV).

III.1.3 Charakterisierung des UK Hc 10S0,4

Am rechten Ende der Insertion im Phagen Hc 10 hybridisierte ein dritter Abschnitt mit dem pHC4e-Klon. Nach Unterklonierung und Sequenzierung (s. Abb. 23) in beiden Orientierungen konnte ein weiteres Exon definiert werden (s.a. C.V, Abb. 55).

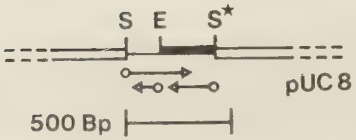


Abb. 23: Restriktionskarte des UK Hc 10S0,4.
▬ Bereich, der mit pHC4e-Klon hybridisierte; S* = Sal I-Schnittstelle des Phagen λ-EMBL3; sonst wie bei Abb. 22.

Da aber kein Übergang in 3'-Richtung in ein Intron die 3'-Grenze des Exons festlegte, mußte die Fortführung des Exons auf Klon Hc 15 zu liegen kommen.

III.2 Charakterisierung des Klons Hc 15

Die Strategie zur weiterführenden Sequenzierung des Exons, dessen aminoterminaler Teil auf dem UK Hc 10S0,4 liegt, sowie eines weiteren Exons in 3'-Richtung wird durch Abbildung 24 veranschaulicht:

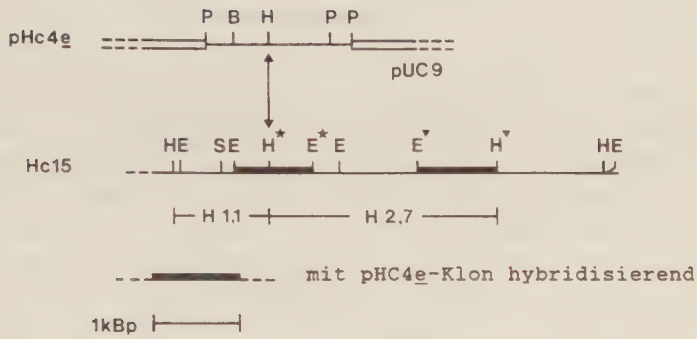


Abb. 24: Vergleich der Restriktionsmuster von pHC4e mit Ausschnitt aus dem rechten Ende der Insertion von Hc 15; H1,1 und H2,7 sind Klone, mit denen die nähere Charakterisierung der Exonbereiche durchgeführt wurde.

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, muß die auf dem pHC4e-Klon kartierte Hind III-Schnittstelle derjenigen auf der genomischen DNA (H*) entsprechen, da sie mitten in einem mit dem pHC4e-Klon hybridisierenden Bereich liegt. Zugleich wird dann auch das 3'-Ende des ansequenzierten Exons (s.o.) zwischen Hind III (H*) und Eco RI (E*) zu liegen kommen. Man kann auch erkennen, daß die mit ▼ gekennzeichnete Eco RI- und Hind III-Schnittstellen nicht auf dem pHC4e-Klon zu finden sind: Ein weiteres Exon sollte sich also zwischen diesen beiden Schnittstellen verbergen. Um dies zu überprüfen, wurde die DNA des Klons Hc 15 mit Hind III geschnitten und die nebeneinanderliegenden Fragmente H1,1 und H2,7 (s. Abb. 24) in pUC8 unterkloniert.

III.2.1 Charakterisierung des UK Hc 15H1,1

Die DNA des UK Hc 15H1,1, dessen Restriktionsmuster mit anschließendem Southern-Transfer und Hybridisierung mit dem 1400 Bp Pst I-Fragment von pHC4e Abbildung 25 zeigt, wurde mit Eco RI und

Hind III verdaut und das 0,4 kBp große Fragment in pUC8 unterkloniert. Die Sequenzierung in beiden Orientierungen ergab eine Überlappung in der Mitte von ca. 100 Basen (Abb. 26 und C.V, Abb. 55). Wie zu erwarten war, bedeutete die Hind III-Schnittstelle noch nicht die 3'-Grenze dieses Exons, d.h. erst die Sequenzierung des darüberhinausgehenden Bereichs in UK Hc 15H2,7 konnte den Übergang in ein Intron bringen.

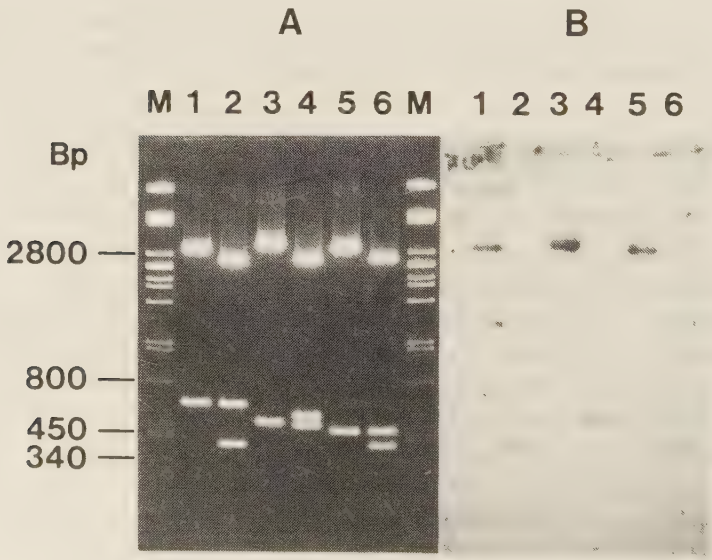


Abb. 25: A: UK Hc 15H1,1, Plasmid-DNA, geschnitten mit Eco RI (Spur 1), Eco RI/Hind III (Spur 2), Sal I (Spur 3), Sal I/Hind III (Spur 4), Eco RI/Sal I (Spur 5) und Hind III/Eco RI/Sal I (Spur 6); sonst wie bei Abb. 17A.
B: UK Hc 15H1,1, nach Southern-Transfer der DNA-Banden; sonst wie bei Abb. 21B.

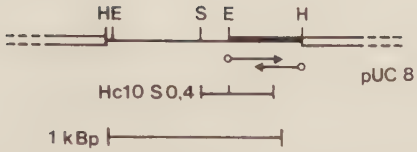


Abb. 26: Restriktionskarte des UK Hc 15H1,1.
---▬▬--- Bereich, der mit dem 1400 Bp Pst I-Fragment hybridisierte; Vergleich mit UK Hc 10S0,4; Pfeile geben Ausmaß und Richtung der Sequenzierung an.

III.2.2 Charakterisierung des UK Hc 15H2,7

Hier stand die Sequenzierungsstrategie nach Unterklonierung des DNA-Fragments Hc 15H2,7 in pUC8 und dessen Restriktionskartierung (Abb. 27) sofort fest.

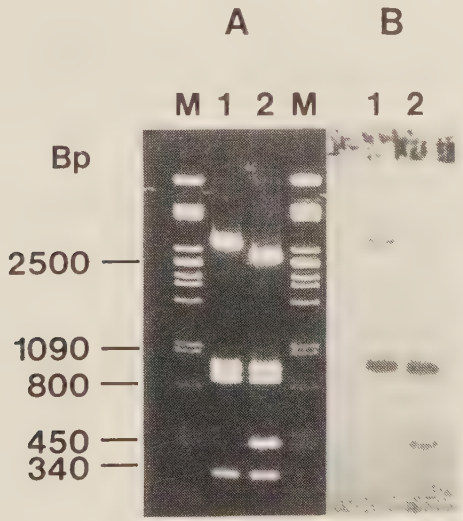


Abb. 27: A: UK Hc 15H2,7, Plasmid-DNA, geschnitten mit Eco RI (Spur 1) und Eco RI/Hind III (Spur 2); sonst wie bei Abb. 17A.
B: UK Hc 15H2,7, nach Southern-Transfer der DNA-Banden; sonst wie bei Abb. 21B.

Die Sequenzierung in beiden Orientierungen des UK HC15H2,7 E/H0,4 in pUC8 (s. Abb. 28) erbrachte den Abschluß des Exons, das mit einer Länge von 397 Basen fast doppelt so lang ist wie die bisher charakterisierten. Es codiert für die ersten beiden Histidinreste des "Kupfer B"-Zentrums. Das nächste Exon liegt, wie Abbildung 28 zeigt, relativ nahe in 3'-Richtung, so daß die Sequenzierung des Unterklons Hc 15H2,7E/H0,95 Aufschluß über dieses Exon bringen sollte.

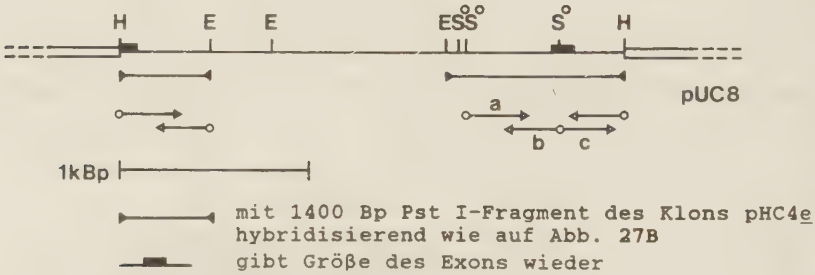


Abb. 28: Restriktionskarte des UK Hc 15H2,7.
Pfeile geben Sequenzierrichtung und Länge an; a, b und c entsprechend den Sau 3AI-Unterklonen von E/H0,9.

Dazu wurde dieser Unterklon von beiden Seiten so weit ansequenziert, daß nur noch eine Lücke von ca. 300 nicht bestimmten Bp in der Mitte bestand. Von der rechten (Hind III-) Seite aus erbrachte die Sequenzierung einen Exon-Intron-Übergang nach dem ASrest Asparagin (Nr. 380, s. C.V, Abb. 56). Um das komplette Exon mit dem aminoterminalen Intron-Exon-Übergang zu definieren, wurde nach folgenden Überlegungen in der Sequenzierungsstrategie verfahren: Im Vergleich des pHC4e-Klons mit einem Restriktionsverdau des E/H0,95 kBp-Fragments mit Sau 3AI zeigte sich, daß in dieser Lücke eine Sau 3AI-Schnittstelle liegen mußte. So konnten nach einem präparativen Verdau dieses E/H0,95 kBp-Fragments mit Sau 3AI aus dem Agarosegel zwei DNA-Banden isoliert und unterkloniert werden:

1. ein 500 Bp-Fragment, dessen Enden mit einem Bam HI-geschnittenen pUC8-Vektor ligiert wurden.
2. ein 350 Bp-Fragment, dessen Sau 3AI und Hind III-Enden mit einem Bam HI und Hind III-geschnittenen pUC8-Vektor ligiert wurden.

Die Sequenzierung beider Klone in beiden Orientierungen des Klons Sau 0,5 (s. a und b in Abb. 28) und in einer Richtung des Klons B/H0,35 (s. c in Abb. 28) schloß die Lücke: Mit einer Länge von 129 Bp konnte ein weiteres, relativ kurzes Exon charakterisiert werden. Es codiert für den dritten Histidinrest (Nr. 234) des "Kupfer B"-Zentrums.

III.3 Charakterisierung des Unterklons Hc 12S3,7

Durch ein rund 6 kBp langes Intron getrennt, konnte in 3'-Richtung das nächste Exon auf Klon Hc 12 in einem Sal I/Eco RI 2,35 kBp-Fragment lokalisiert werden (s. Abb. 21). Zur näheren Eingrenzung des Exons wurde die DNA des Phagen Hc 12 mit Sal I geschnitten und ein Sal I 3,7 kBp-Fragment, das zusätzlich zu dem Sal I/Eco RI 2,35 Fragment in 3'-Richtung noch einen 1,35 kBp großen Abschnitt besitzt, in pUC8 unterkloniert. Dieser Klon Hc 12S3,7 wurde dann mit den Enzymen Sal I, Eco RI, Pst I und Hinc II näher charakterisiert (Abb. 29).

Nach Unterklonierung und Sequenzierung des Hinc II/Pst I 0,6 kBp-Fragments in pUC8 (s. Abb. 30) in beiden Richtungen konnte das Exon fast vollständig definiert werden; es fehlten allerdings 24 Bp in 5'-Richtung. So sollte die Sequenzierung des Hinc II/Sal I 0,6 kBp-Fragments die restlichen 24 Bp bestimmen. Es konnte aber nur Intronbereich erhalten werden. Die nächste Abbildung liefert dafür eine Erklärung:

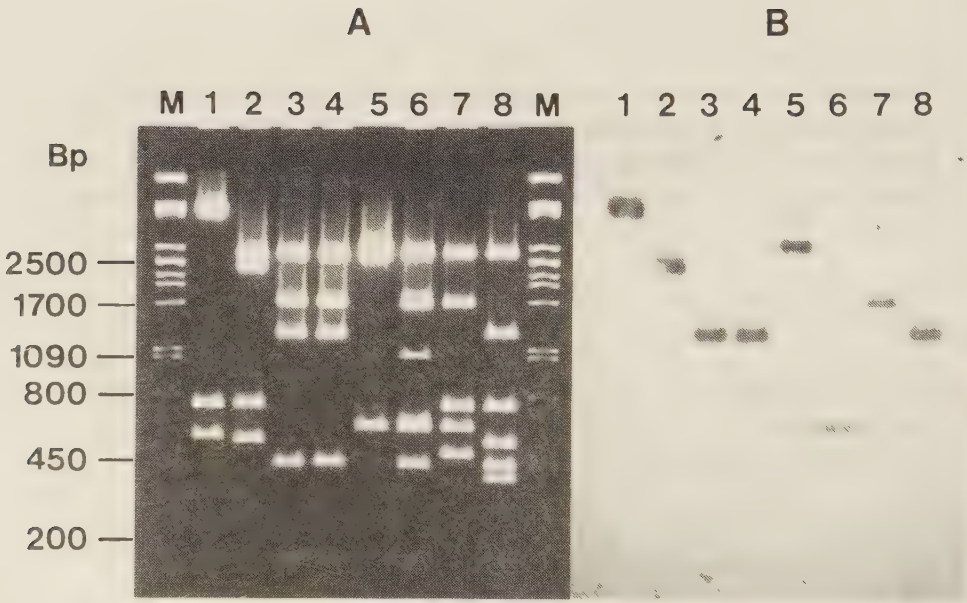


Abb. 29: A: UK Hc 12S3,7, Plasmid-DNA, geschnitten mit Eco RI (Spur 1), Eco RI/Sal I (Spur 2), Pst I/Sal I (Spur 3 und 4), Hinc II (Spur 5), Hinc II/Pst I (Spur 6), Eco RI/Hinc II (Spur 7) und Pst I/Hinc II/Eco RI (Spur 8); sonst wie bei Abb. 17A.
B: UK Hc 12S3,7, nach Southern-Transfer der DNA-Banden wie bei A, anschließend wie bei Abb. 21B.

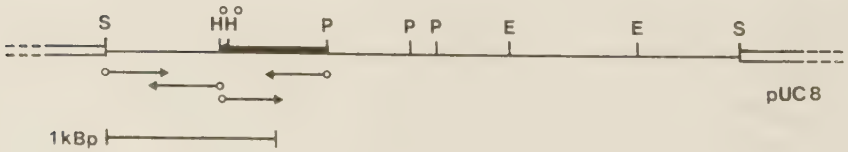


Abb. 30: Restriktionskarte des UK Hc 12S3,7.
--▬▬-- Bereich, der mit den 1400 Bp Pst I-Fragment des pHC4e-Klons hybridisierte; Pfeile geben Sequenzierrichtung und Länge an;
man beachte, daß die zwei Hinc II-Schnittstellen in der Mitte des Klons S/P1,3 erst nach Sequenzierung kartiert wurden.

```
Exon von Hc 15H2,7 |
          E/H0,95  |          Exon von Hc 12S3,7S/P1,3

pHC4e    : CCA GAA GAT|TTG ACA TGT CCA GGA GTT CAC GTA GTC AAC GTA
            P   E   D | L   T   C   P   G   V   H   V   V   N   V
gen. DNA: Intron...ag|TTG ACA TGT CCA GGA GTT CAC GTA GTC AAC GTA
                     Hinc II                          Hinc II
```

Abb. 31: Vergleich der Sequenzen von pHC4e mit genomischen DNA-Sequenzen im Bereich eines Intron-Exon-Überganges von Exon Hc 12S3,7S/P1,3.
AS sind im Fettdruck dargestellt.

Da alle bisher untersuchten Intronsequenzen (s. D.IV.2) am 3'-Ende mit dem Sequenzmotiv ....AG in ein Exon übergehen, wird durch das Spleißen der mRNA eine Hinc II-Schnittstelle, die im Genom am Übergang vom Intron zum Exon liegt, zerstört. Die erste Base der Erkennungssequenz - ein G - wird durch ein T ersetzt. 23 Bp "stromabwärts" im Exon liegt eine weitere Erkennungssequenz (GTPyPuAC) des Enzyms Hinc II, so daß dieses kurze Fragment in der Restriktionsanalyse (Abb. 29) nicht entdeckt werden konnte. Im 1,5 %igen Agarosegel können nur DNA-Fragmentlängen bis zu einer Minimallänge von 100 Bp durch Anfärben (der DNA-Banden) mit Etbr identifiziert werden (Maniatis et al., 1982). Für die restlichen 19 noch nicht bestimmten Bp wurde folgende Sequenzierungsstrategie verwendet:

Eine Isolierung kleiner DNA-Fragmente ist sehr aufwendig; zusätzlich wird auf diese Weise keine Absicherung der Basensequenzen durch überlappende Sequenzierung erreicht. Daher wurde auf die Methode der Sequenzierung nach gerichtetem Exonukleaseabbau der Insertion zurückgegriffen. Das Sal I/PstI 1,3 kBp große Fragment wurde in pUC19 unterkloniert, um dann durch Exonukleaseabbau (s. B.II.14) von der Sal I-Schnittstelle gesehen den DNA-Strang schrittweise einzukürzen (Abb. 32).

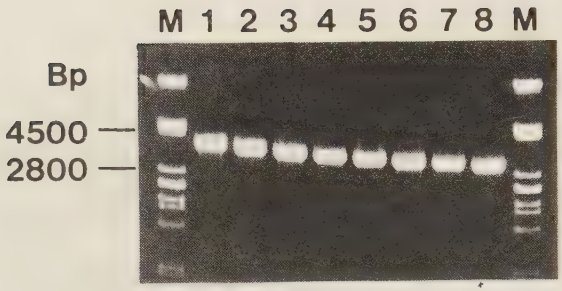


Abb. 32: UK Hc 12S3,7S/P1,3, Bestimmung der Einkürzungslänge durch Elektrophorese im 1,2 %igen Agarosegel; Spur 1-8: Exonukleaseabbau wurde nach 1, 3, 5 min usw. gestoppt und ein Aliquot nach Behandlung mit Exonuklease VII im Gel aufgetragen; sonst wie bei Abb. 17A.

Die Länge einiger ausgewählter, eingekürzter Klone wurde nach Restriktionsverdau mit Hind III und Eco RI im Agarosegel bestimmt (Abb. 33.). In Abbildung 34 werden die zur Sequenzierung verwendeten Deletionsmutanten gezeigt.

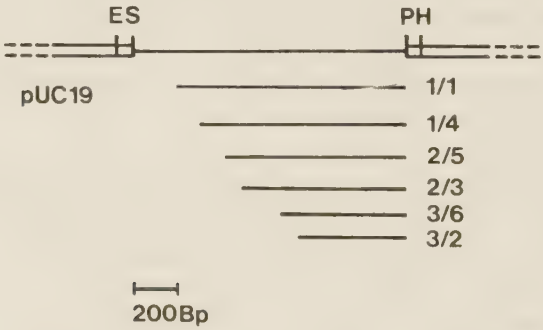


Abb. 33: Konstruktion von Deletionsmutanten des UK Hc 12S3,7S/P1,3.
Darstellung des Ausmaßes an gerichteter DNA-Einkürzung nach 1minütiger (1/1; 1/4), 3minütiger (2/3; 2/5) und 5minütiger (3/2; 3/6) Inkubation mit Exonuklease III.

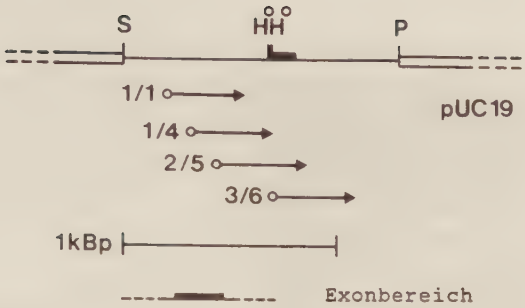


Abb. 34: Analyse der Sequenz ausgewählter Deletionsmutanten des UK Hc 12S3,7S/P1,3.
Pfeile geben Ausmaß und Richtung der Sequenzierung an.

Mit den Klonen 1/4 und 2/5 konnte die bestehende Lücke von 19 Bp geschlossen werden. Die vollständige Sequenz des UK Hc 12S3,7 S/P1,3 ist in der Abb. 57, Abschnitt C.V, dargestellt.

III.4 Charakterisierung des Unterklons Hc 4H2,2

Am rechten Ende der Insertion in Klon Hc 4 (Abb. 13) konnte der nächste 3'-liegende Exonbereich eingegrenzt werden. Nach Verdau der Phagen-DNA mit Hind III wurde ein Hind III 2,2 kBp-Fragment isoliert, auf dem der mit dem pHC4e-Klon hybridisierende Bam HI/Hind III Abschnitt liegt. Eine nähere Charakterisierung des Klons Hc 4H2,2 in pUC9 wurde mit den Enzymen Hind III, Bam HI und Pst I durchgeführt (Abb. 35).

Der mit dem pHC4e-Klon hybridisierende Bereich konnte auf ein Bam HI/Pst I 1,1 kBp-Fragment eingeschränkt werden. Dessen Sequenzierung im pUC8-System in beiden Orientierungen erbrachte zwar von der Pst I-Seite her gesehen die gesamte Sequenz dieses Exons, jedoch blieb eine Lücke von rund 400 Bp bestehen (Abb. 36: ⊢-------⊣).

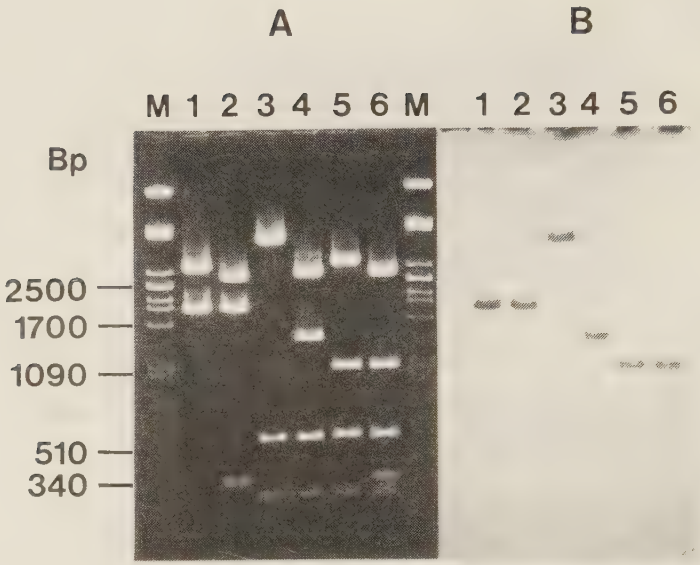


Abb. 35: A: UK Hc 4H2,2, Plasmid-DNA, geschnitten mit Bam HI (Spur 1), Hind III/Bam HI (Spur 2), Pst I (Spur 3), Hind III/Pst I (Spur 4), Bam HI/Pst I (Spur 5) und Hind III/Pst I/Bam HI (Spur 6); sonst wie bei Abb. 17A.
B: UK Hc 4H2,2, nach Southern-Transfer der DNA-Banden wie bei A, anschließend wie bei Abb. 21B.

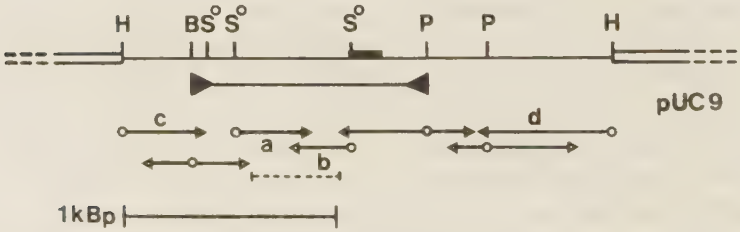


Abb. 36: Restriktionskarte des UK Hc 4H2,2.
▶———◀ Bereich, der nach Abb. 35 mit dem 1400 Bp Pst I-Fragment des pHC4e-Klons hybridisierte; ---▬--- gibt Größe des Exons wieder; Pfeile geben Sequenzierrichtung und Länge an; a und b: Sequenzen des Sau 3AI UK von B/P1,1; c und d: Sequenzen des UK Hc 4 H2,2; S°-Schnittstellen nach Sequenzierung bestimmt.

Durch vollständigen Verdau des Bam HI/Pst I 1,1 kBp-Fragments mit dem Enzym Sau 3AI wurde ein 450 Bp langes Fragment erhalten, dessen Unterklonierung in einen mit Bam HI geschnittenen pUC8-Vektor mit anschließender Sequenzierung in beiden Richtungen (Abb. 36 a und b) die erwartete Überlappung von mindestens 100 Bp ergab. Nach Sequenzierung weiterer Unterklone (H/B0,3; P0,3 und P/H0,5) sowie Ansequenzierung des gesamten UK H2,2 (Abb. 36 c und d) konnte eine lückenlose Basensequenz des UK Hc 4H2,2 erstellt werden (C.V, Abb. 58).

III.5 Charakterisierung des Klons Hc 6

Durch ein verhältnismäßig großes Intron von ca. 14 kBp Länge getrennt, konnte der nächste Exonbereich auf den Klonen Hc 11 und Hc 6 kartiert werden (Abb. 13). Die genauere Eingrenzung dieses Bereichs beschränkte sich auf Klon Hc 6.

Schon durch die relativ grobe Restriktionsanalyse des Klons Hc 6 mit darauffolgender Hybridisierung der DNA-Banden mit dem pHC4e-Klon war zu vermuten, daß sich in dem rund 5,3 kBp großen Bereich, der von einer Sal I-Schnittstelle und einer Eco RI-Schnittstelle flankiert wird, zwei Exons verbergen. Diesen Hinweis liefert eine weitere Eco RI-Schnittstelle, die nicht auf Klon pHC4e kartiert und die 5,3 kBp in zwei Abschnitte zu 0,6 und 4,7 kBp unterteilt (Abb. 37).

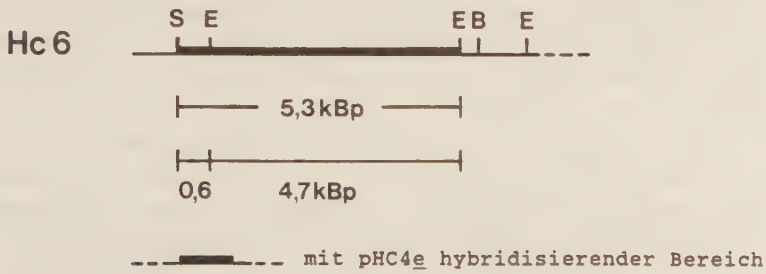


Abb. 37: Ausschnitt aus dem linken Endabschnitt der Insertion des Phagen Hc 6.

III.5.1 Charakterisierung der Unterklone Hc 6E/S0,6 und Hc 6S0,8

Ähnlich dem UK Hc 12S3,7S/P1,3 konnte man auch bei Klon Hc 6E/S0,6 die Zerstörung der Erkennungssequenz eines Restriktionsenzyms durch Spleißen der mRNA vermuten (Abb. 38):

```
Exon von Hc 4H2,2          | Exon von Hc 6E/S0,6
pHC4e   ... AAG GCC ACT CTC GAC CCT GGT ...
                        | L   D   P   G
Intron von Hc 6S0,8 ..ag|TC GAC CCT GGT ...
                        Sal I
```

Abb. 38: Vergleich der Sequenzen von pHC4e mit genomischen DNA-Sequenzen im Bereich eines Intron-Exon Überganges von Exon Hc 6E/S0,6.
AS sind im Fettdruck dargestellt.

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, reicht das Exon auf Klon Hc 4H2,2 bis zur ersten Base des Codons für die AS Leucin. Da ein Intron am 3'-Ende das Sequenzmotiv ...AG besitzt, und die folgenden Basen auf dem nächsten Exon ...TC GAC sind, wird durch Zusammensetzen der Sequenzen eine Sal I-Schnittstelle mit der Erkennungssequenz 5'-GTCGAC-3' auf der genomischen DNA regeneriert. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurden zunächst vom linken Ende der Insertion des Phagen Hc 6 zwei Abschnitte unterkloniert: Hc 6E/S0,6 und Hc 6S0,8. Abbildung 39 zeigt eine Restriktionsanalyse des UK E/S0,6 mit den Enzymen Eco RI, Sal I und Pst I.

Das Restriktionsenzym Pst I unterteilt die Insertion in ein 100 und ein 500 Bp-Fragment. Da beide Fragmente mit dem gesamten pHC4e-Klon hybridisieren, ist die Pst I-Schnittstelle des Klons pHC4e mit derjenigen auf der genomischen DNA identisch. Im folgenden wurden die Unterklone Hc 6E/S0,6 und Hc 6S0,8 wie unter Abbildung 40 in beiden Orientierungen sequenziert.

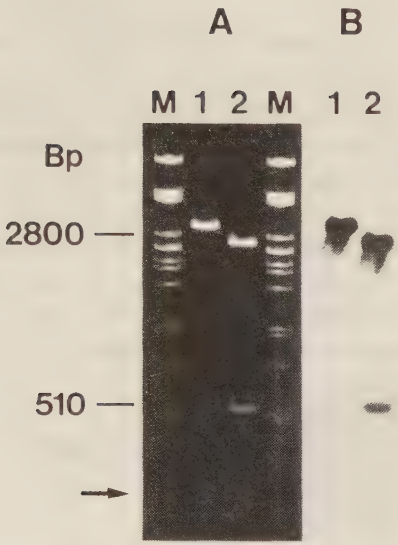


Abb. 39: A: UK Hc 6E/S0,6, Plasmid-DNA, geschnitten mit Pst I (Spur 1) und Pst I/Eco RI (Spur 2); sonst wie bei Abb. 17A; Pfeil gibt Lage des 100 Bp Fragments an.
B: UK Hc 6E/S0,6, nach Southern-Transfer der DNA-Banden wie bei A; anschließend Hybridisierung mit bio-11-dUTP markiertem pHC4e-Klon; sonst wie bei Abb. 21B; Markierung der 100 Bp Bande nur sehr schwach.

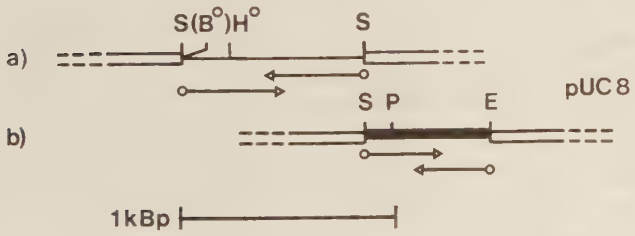


Abb. 40: Restriktionskarte der UK S0,8 (**a**) und E/S0,6 (**b**).
▬▬ Bereich, der mit dem pHC4e-Klon hybridisierte; H°-Schnittstelle erst nach Sequenzierung bestimmt; S(B°): Sal I-Schnittstelle des Phagen λ-EMBL3 mit angrenzender unspezifischer Bgl II-(5'-GGATCT-3') Schnittstelle; Pfeile geben Richtung und Ausmaß der Sequenzierung an.

Die Sequenzanalyse des UK Hc6S0,8 erbrachte das erwartete 3'-Ende eines Introns mit dem Übergang ...AG, während diejenige des UK Hc 6E/S0,6 das nächste Exon definierte (C.V, Abb. 59).

Um die Sequenzen im Bereich der Sal I-Schnittstelle abzusichern, wurde der gesamte Abschnitt zwischen Phagenende (Sal I-Schnittstelle) und der Eco RI-Schnittstelle aus dem Phagengenom mit Hilfe der Enzyme Bgl II (schneidet hier unspezifisch bei 5'-GGATCT-3'!) und Eco RI herausgeschnitten, in einen Bam HI und Eco RI geschnittenen pUC8-Vektor unterkloniert und die Enden in beiden Orientierungen ansequenziert (Abb. 41).

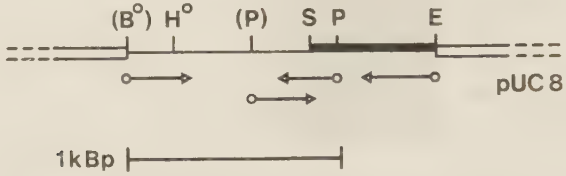


Abb. 41: Restriktionskarte des UK Bg/E1,4.
(P): unspezifische Pst I-(5'-ATGCAG-3') Schnittstelle; sonst wie bei Abb. 40.

Da die Sequenzen der Insertionsenden des UK Hc 6Bg/E1,4 mit denjenigen der Klone Hc 6S0,8 und Hc 6E/S0,6 übereinstimmten, sollte die Unterklonierung des Abschnitts Bgl II bis Pst I mit anschließender Sequenzierung die erwünschte Absicherung im Bereich der Sal I-Schnittstelle erbringen. So wurde die DNA des Klons Hc 6Bg/E1,4 mit Pst I geschnitten, um nach Auftrennung im präparativen Agarosegel die zu erwartende Pst I 0,9 kBp-DNA-Bande zu isolieren. Zusätzlich zu dieser Bande konnte eine schwächere 0,4 kBp DNA-Bande isoliert werden. Deren Unterklonierung in pUC8 und anschließende Sequenzierung in beiden Richtungen (a und b, Abb. 41) lieferte die Überlappung im Bereich der Sal I-Schnittstelle. Ein Vergleich mit den Sequenzen des UK Hc 6S0,8 erbrachte vollständige Übereinstimmung bis auf die zweite Schnittstelle des Enzyms Pst I, das unspezifisch an der Hexanukleotidsequenz 5'-ATGCAG-3' geschnitten haben muß (Abb. 42).

```
Hc 6S0,8          :    5'...CTATATATGCAGAATTAT...3'
Hc 6Bg/E1,4P0,4:                 CTGGACAATTAT...
                                 Pst I
```

Abb. 42: Vergleich der Sequenzen des UK Hc 6S0,8 mit Sequenzen des UK Hc 6Bg/E1,4P0,4 im Bereich der Klonierungsstelle von Hc 6 Bg/E1,4P0,4.

III.5.2 Charakterisierung des Unterklons Hc 6E4,7

Der in carboxyterminaler Richtung letzte mit dem pHC4e-Klon hybridisierende Abschnitt ist das 4,7 kBp lange Fragment zwischen zwei Eco RI-Schnittstellen. Eine nähere Eingrenzung des hybridisierenden Bereichs konnte durch dessen Unterklonierung in pUC8 mit anschließender Restriktionsenzymkartierung erstellt werden (Abb. 43).

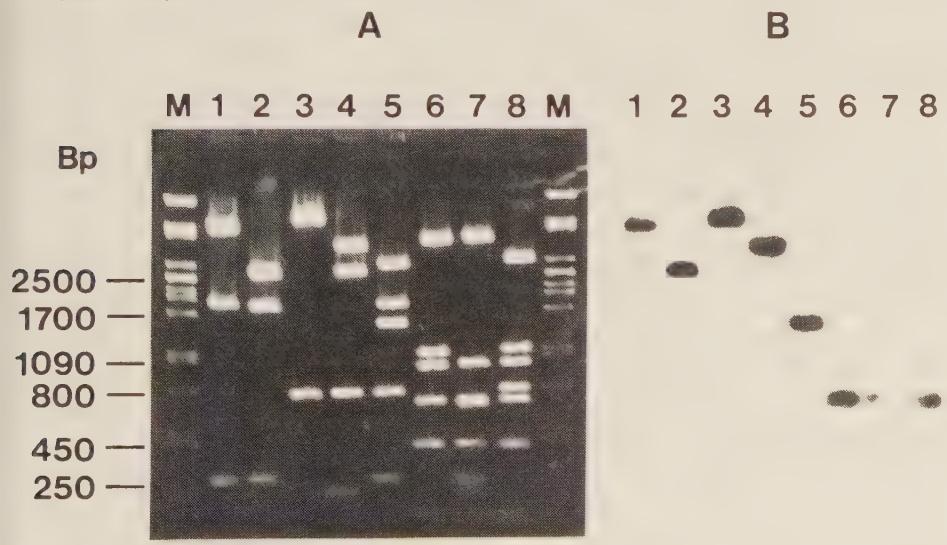


Abb. 43: A: UK Hc 6 E4,7, Plasmid-DNA, geschnitten mit Pst I (Spur 1), Pst I/Eco RI (Spur 2), Bgl II (Spur 3), Eco RI/Bgl II (Spur 4), Pst I/Bgl II (Spur 5), Hinc II (Spur 6), Hinc II/Pst I (Spur 7) und Hinc II/Bgl II (Spur 8); sonst wie bei Abb. 17A.

B: UK Hc 6 E4,7, nach Southern-Transfer der DNA-Banden wie bei A, anschließend Hybridisierung mit α-^{32}P markiertem 250 Bp Pst I-Fragment von pHC4e nach "random-hexamer-priming"-Methode; Hybridisierung und Waschen wie im Methodenteil angegeben; Exp.: 20 h.

In Abbildung 44 ist die weitere Unterklonierung und Sequenzierung des gesamten UK Hc 6E4,7 erläutert:

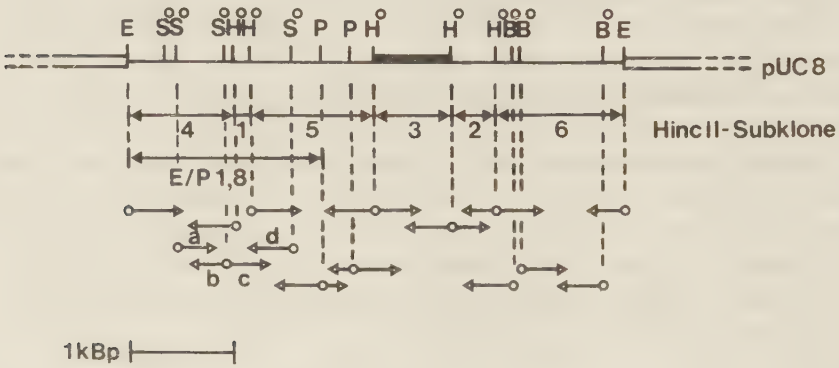


Abb. 44: Restriktionskarte des UK Hc 6E4,7.
1 bis 6: Hinc II-Subklone; a und b, sowie c und d: Sequenzen der Sau 3AI-Subklone von E/P1,8;
---▬--- Bereich, der nach Abb. 43 mit α-^{32}P markiertem 250 Bp Pst I-Fragment von pHC4e hybridisierte;
Pfeile geben Länge und Richtung der Sequenzierung an.

Folgende Strategie ermöglichte es, den UK Hc 6E4,7 durch seine DNA-Sequenz relativ zügig zu charakterisieren:

Durch präparativen Verdau der DNA des Klons Hc 6E4,7 mit dem Enzym Hinc II, folgender Isolierung aller sechs Fragmente (Fragment Hi6 war noch über Eco RI mit dem Vektor verbunden), sowie deren Sequenzierung in beiden Orientierungen konnten die Basensequenz der Unterklone Hi1, Hi2 und Hi3 vollständig aufgeklärt werden. Hi3 lieferte das letzte Exon für die Hc UEe mit dem Stoppcodon UAG und typischen 3'-untranslatierten Sequenzen wie z.B. AATAAA als Erkennungssequenz für die poly(A)-Polymerase. Hi4, Hi5 und Hi6 konnten nicht vollständig durchsequenziert werden. Mit folgenden Unterklonierungs- und Sequenzierungsschritten wurden sowohl die Lücken geschlossen, als auch durch Überlappung die Sequenzen um die Hinc II-Schnittstellen abgesichert:

Nach Verdau der DNA des UK Hc 6E4,7 mit Eco RI, Bgl II und Pst I und Isolierung der entsprechenden DNA-Banden konnten folgende Unterklone etabliert werden: P0,3, Bg0,8, Bg/P1,6 und E/P1,8. Die Sequenzanalyse von Bg0,8 schloß die Lücke in der 3'-untranslatierten Region und diejenige von Bg/P1,6 lieferte die Daten für die Orientierung der DNA-Sequenzen des UK Hi2. Die Sequenzdaten von P0,3 und E/P1,8 (von der Pst I-Seite her gesehen) verknüpften die Sequenzen von Hi5, so daß auch UK Hi5 vollständig in seiner Sequenz aufgeklärt war. Es blieb aber das Problem, eine kleine Lücke von 50 Bp auf Klon Hi4 zu schließen und die Orientierung der DNA-Sequenz des UK Hi1 zu bestimmen. Dazu wurde, da ein gerichteter Exonukleaseabbau des UK E/P1,8 auf Grund der ungünstigen Lage der Restriktionsschnittstellen Eco RI und Pst I (beide terminal entgegengesetzt) ausgeschlossen werden mußte, das E/P1,8 kBp-Fragment mit Sau 3AI total verdaut und die Fragmente mit Hilfe der "shot gun"-cloning Methode in pUC8 unterkloniert. Aus der Vielzahl der entstandenen Unterklone konnten zwei mit einer Insertionslänge von 500 bzw. 650 Bp isoliert werden. Die Sequenzanalyse (a und b, bzw. c und d in Abb. 44) der entsprechenden Klone erbrachte die notwendigen Überlappungen. Somit konnte die durchgehende Sequenz des Introns, das die beiden letzten Exons verbindet, etabliert werden (C.V,Abb. 59).

IV Isolierung des für die Hc UEe ersten codierenden Exons mit anschließender 5'-untranslatierter Region

Mit Hilfe des pHC4e-Klons konnten in den hybridisierenden Bereichen 8 Exons der Hc UEe bestimmt werden. Da dem pHC4e-Klon aminoterminal 218 Basen fehlen (VOIT, 1986), und die Sequenzierung des ersten Exons auf Klon Hc 10 schon 10 AS aminoterminal darüberhinausging (Abb. 45),

pHC4e	5'-CTA GCA AAG CAA ...3'
Exon von Hc 10X/S3,2	5'...AG/CT GCA AAA GAC TTC GAT GAA GTG ATA AAT CTA GCA AAG CAA ...3'
	A K D F D E V I N L A K Q

Abb. 45: Vergleich der aminoterminalen Sequenzen von pHC4e mit Exonsequenzen auf Klon Hc 10X/S3,2.

mußte noch nach einer für die Hc UEe spezifischen Oligonukleotidprobe aus der Sequenzabfolge der N-terminalen 63 AS, die proteinchemisch bereits bestimmt wurden (SCHNEIDER et al., 1983), gesucht werden. Sie sollte als Hybridisierungsprobe zum Auffinden des vermutlich ersten Exons des Gens für die UEe auf Klon Hc 1 dienen. Eine geeignete Aminosäuresequenz ist 5'-D-F-H-E-E-D-3' in Pos. 46-51 der UEe. Sie erfüllt die an sie gestellten Forderungen in idealer Weise (MASON and WILLIAMS, 1985): Mit einer Länge von 6 Aminosäuren ist die korrespondierende Oligonukleotidprobe lang genug und zeigt zudem eine geringe Codonvariabilität (Faktor 32, d.h. 32 verschiedene Sequenzen; s. Abb. 46).

Hc UE<u>a</u>:	...	$\overset{40}{R}$	N	Q	F	F	S	C	F	Y	P	$\overset{50}{D}$	H	L	E	Q	A	...
HC UE<u>b</u>:	...	R	G	V	I	F	S	P	F	H	E	E	H	I	N	E	A	...
Hc UE<u>d</u>:	...	R	G	T	L	F	G	S	F	H	E	E	H	L	A	E	A	...
Hc UE<u>e</u>:	...	Q	G	E	L	F	S	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>H</u>	<u>E</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	L	E	E	A	...

↓

$$5'\text{-}GA\overset{T}{C}TT\overset{T}{C}CA\overset{T}{C}GA\overset{A}{G}GA\overset{A}{G}GA\overset{T}{C}\text{-}3'$$

↓

$$3'\text{-}CT\overset{A}{G}AA\overset{A}{G}GT\overset{A}{G}CT\overset{T}{C}CT\overset{T}{C}CT\text{-}5'$$

synthetisches 17mer Oligonukleotidgemisch

Abb. 46: Synthetisches 17mer, spezifisch für die Hc UE<u>e</u>.
Zur Abdeckung der Codonvariabilitäten werden 32 unterschiedliche Oligonukleotide benötigt; Numerierung der AS nach SCHNEIDER et al. (1983).

Hybridisierungs- und Waschbedingungen wurden nach folgender Tabelle gewählt:

Tab. 1: "Oligo <u>e</u>"-Nukleotidprobe.
Berechnung der Waschtemperaturen nach Hybridisierung aufgrund des G/C - A/T Gehalts der gemischten Oligonukleotidprobe.

Zusammensetzung des Oligonukleotidgemisches:

$$5'\text{-}TC\overset{T}{C}TC\overset{T}{C}TC\overset{A}{G}TG\overset{A}{G}AA\overset{A}{G}TC\text{-}3'$$

Minimale Anzahl an G/C-Resten: 5
Maximale Anzahl an A/T-Resten: 12
} T_{Dmin} = 44°C

Minimale Anzahl an A/T-Resten: 7
Maximale Anzahl an G/C-Resten: 10
} T_{Dmax} = 54°C

Hybridisierungstemperatur nach MASON and WILLIAMS (1985): 34°C

Klon Hc 1 trägt eine 13 kBp lange Insertion, die rund 12 kBp aminoterminal über den ersten mit dem pHc4e-Klon hybridisierenden Bereich auf Klon Hc 10 (C.III.1.2) hinausgeht. Nach den bisher gefundenen durchschnittlichen Intronlängen von 6-7 kBp sollte das erste Exon für die Hc UEe ungefähr in der Mitte der Insertion des Klons Hc 1 zu liegen kommen. Nach Restriktionsverdau der DNA von Hc 1, anschließendem Southern-Transfer und Hybridisierung mit einer für die Hc UEe spezifischen Oligonukleotidprobe bei 35°C über Nacht, wurden die Filter bei T_{Dmin} = 44°C 2 min gewaschen (Abb. 47).

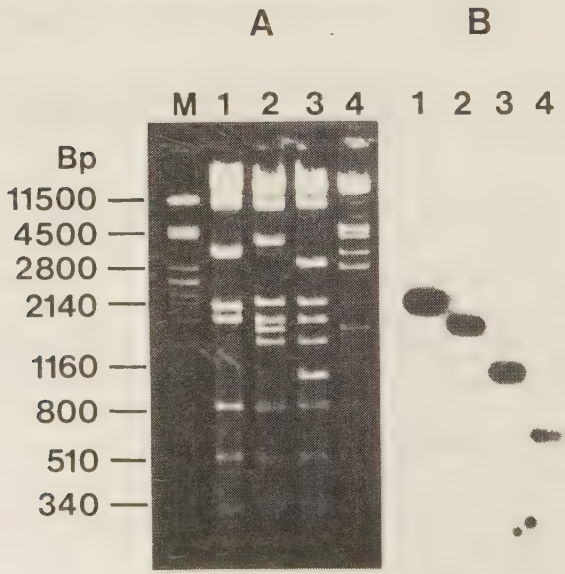


Abb. 47: A: Klon Hc 1, Phagen-DNA, geschnitten mit Eco RI (Spur 1), Eco RI/Sal I (Spur 2), Bam HI/Eco RI/Sal I (Spur 3) und Hind III/Eco RI/Sal I (Spur 4); sonst wie bei Abb. 17A.
B: Klon Hc 1, nach Southern-Transfer der DNA-Banden wie bei A, anschließend Hybridisierung mit γ-^{32}P markiertem Oligo "e" Nukleotidgemisch; Hybridisierungstemp.: 35°C; Waschen: 5 min. in 6 x SSC, 0,1 % SDS bei 44°C; Exp.: 60 h.

Abbildung 48 zeigt das Restriktionsmuster des Klons Hc 1 mit dem Abschnitt Eco RI/Hind III, der mit dem Oligonukleotid hybridisiert.

Abb. 48: Restriktionskarte des Klons Hc 1.
---▭--- mit Oligo "e" Nukleotidgemisch hybridisierender Bereich; ---▬--- mit pHC4e-Klon hybridisierender Bereich (s. Abb. 5).

Um einen etwas größeren 5'-untranslatierten Bereich zu erfassen, wurde die DNA des Klons Hc 1 mit Eco RI und Sal I gespalten und das unter anderen entstehende E/S1,6 kBp-Fragment in pUC8 unterkloniert. Eine nähere Charakterisierung dieses Klons mit den Enzymen Eco RI, Sal I, Xba I und Bgl II und folgender Hybridisierung mit Oligo "e" wird in Abbildung 49 dargestellt.

Die daraus folgende Restriktionskarte des UK Hc 1E/S1,6 mit Sequenzierungsstrategie wird in Abbildung 50 erläutert.

Die Sequenzierung des UK Hc 1E/S1,6X°/E0,3 und Hc 1E/S1,6X°/H 0,3 - jeweils in beiden Orientierungen - klärte die Sequenz des ersten Exons für die Hc UEe auf (s. C.V, Abb. 52). Die typische Erkennungssequenz für die RNA-Polymerase II - die TATA-Box - konnte 100 Bp vom Initiationscodon AUG festgelegt werden. Weitere typische Promotorelemente wie CAAT-Box, eventuelle Enhancer, sowie ein ungewöhnliches, sich wiederholendes Sequenzmotiv von $G(T)_n$ zwischen der Bam HI und der Sal I-Schnittstelle werden in der Diskussion (s. D.IV.4) besprochen.

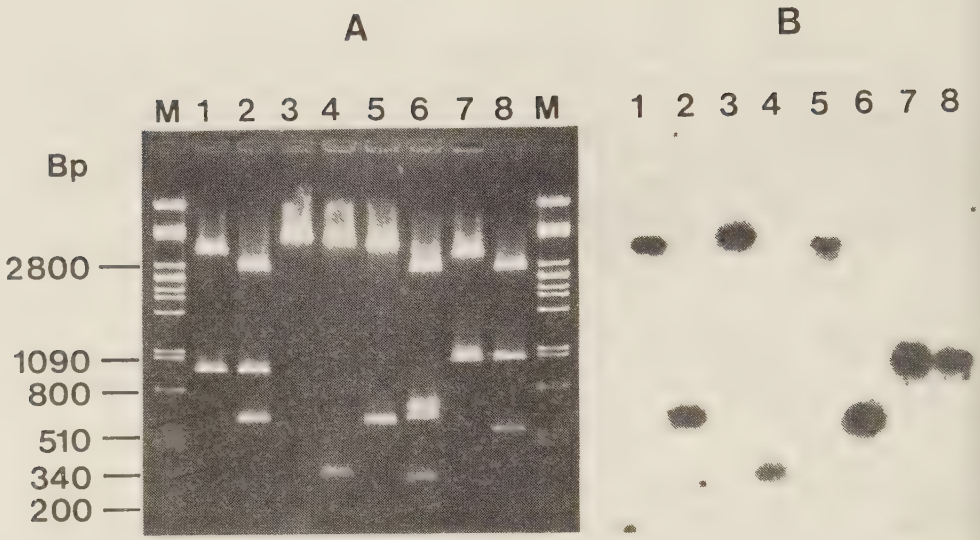


Abb. 49: A: UK Hc 1E/S1,6, Plasmid-DNA, geschnitten mit Hind III (Spur 1), Hind III/Eco RI (Spur 2), Bgl II/Bam HI (Spur 3), Xho I/Eco RI (Spur 4), Xho I/Bgl II (Spur 5), Hind III/Bgl II/Eco RI (Spur 6), Bam HI/Eco RI (Spur 7) und Bam HI/Eco RI/Sal I (Spur 8); sonst wie bei Abb. 17A.

B: nach Southern-Transfer der DNA-Banden wie bei A, anschließend Hybridisierung mit γ-^{32}P markiertem Oligo "e" Nukleotidgemisch; Hybridisierungstemp.: 35°C; Waschen: 5 min. in 6 X SSC, 0,1 % SDS bei 44°C; Exp.: 48 h.

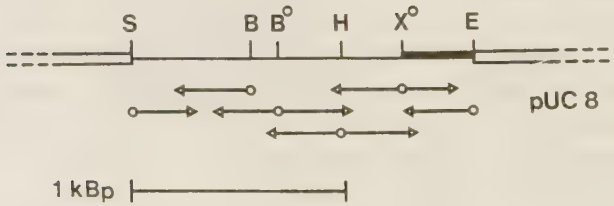


Abb. 50: Restriktionskarte des UK Hc 1E/S1,6.
---▬--- mit Oligo "e" Nukleotidgemisch hybridisierender Bereich; X°: Xho I; Pfeile geben Sequenzierrichtung und Länge an.

V Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Klonierung und Charakterisierung eines Gens für die Hc UEe der Vogelspinne E. californicum

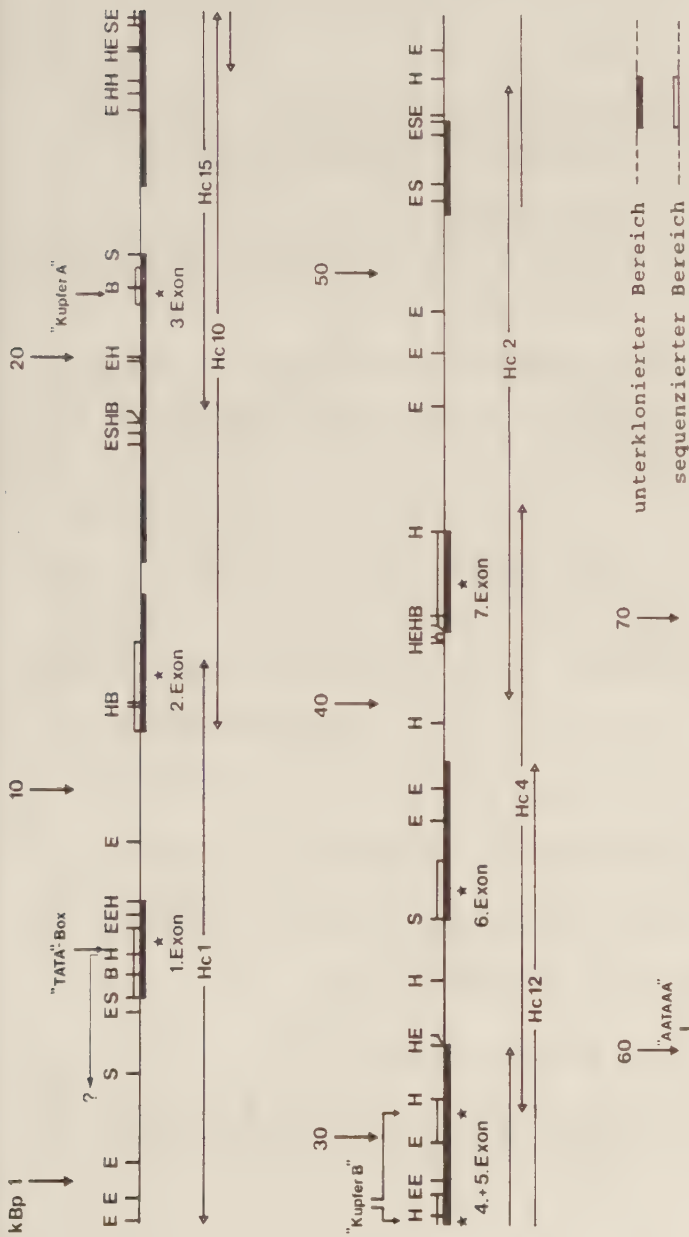


Abb. 51: Struktur eines Gens für die Hc UEe; acht überlappende genomische Klone (Hc 1, Hc 2, Hc 4, Hc 6 , Hc 10, Hc 11, Hc 12 und Hc 15), die das Gen charakterisieren, sind eingezeichnet; ? ← Ungewissheit über Authentizität dieses DNA-Abschnittes (s. dazu C.IV.4).

```
Sal I
GTCGACATGATTTAATACCGAAAATGTGGCAATAAATTCTCACACAGGTAATTGCACTTC 60
CCCTATTGCATCTGCTTACAGATAGGTATTTTCAAAAAATGGCTTAGTTTTAATTTTTGT 120
GCTGTTTGATTAATGAAAAGTGATTTTGTTACCTCAACACGCTAAAAAATCAGAAAAGCA 180
AATAGAAAAAAATTACTGCTGCCAAAATGGAATTGAAAATTTAAAAATGTATTAATTGGT 240
TGCATATAACATTTTTCTGATGAACTGGAAACTCAAAAGTACCAAACTTTGAAGAACAGC 300
TAGTTGCGAGGAAATCGACTCAACAAAAAACAAATTCTTGTTTTGTTTTTGTTTTGTTTT 360
GTTTTTTTACTTGCTGTGTTATTCTTTCCCTTTTCTATCGTCTTACTATGGCCTAAAATT 420
AGTAACTCTTAGTAACTTCAAATTTCCATTTCCGTCAAAAACATATAAAGTTCGTGCATC 480
                                                Bam HI
ATCATACATTCCTGCGATACCTTGAAAATCTTTCAACACTAGGATCCAGTGAAAAGGGCA 540
GAACATATCCTAGATGAGGGCACAAACACAAATCGCAAAAAAATTTGGTTTACTCGAATC 600
TCCAGAAGCGTATTGGTTCACTGCAAGTAAATTCCCAAATTTTGGATATTTCGAGAGACA 660
            Bgl II
TCGCGTGTAATGAGATCTGGAGGGGTTTATCAAACAGCGATTTTCCTTTGCCATGTACAA 720
ACTTGAGTACTATTACATGAAGTTTTATAGAACTTATCGTGCAGATACATGGACAGACAA 780
ACAAGACAAAATCTGCGATTTGTTTGTTTTTTATGAAATAATTGTGTTTTGTATTTTGTT 840
TTTCTTAATTTTCCCCTTAGTTCGGATTCACTGAATTGTCTGCATCGTCTCAAATATTTT 900
CACGAAAGTAAATCATAAGACTGAATTTACCGATAAATCCCCTTCTTCATGGTTGTCTAA 960
TATTAGCATCCAT
Hind III
                -200
AAGCTTCGCGACATTTCCTCTCAAGTCGAACTTAGTGCCAACAGCAAACATTTCCGTGAA 1033
                                                          Sau
                -140        -130                     -100
ACAGCCTAATTGTCTCGCCCTTGGGTGACCACCGGAAACTGGCGGTCTATAAAAGTCCTG 1093
3AI                                                 Sau 3AI
                -80         -70         -60
ATCATCTCTTCCAGAGCACGCTTGACAGTTGAGCCTCGGGATCGTTCCTTTGTTATCCTT 1153
          Sau 3AI
   -30                  -10         -1   +1
CTCATCCCAGATCCAGCTGAGTAGCCAGCCATC    ATG CCG GAC AAA CAG AAG  1204
                                      M   P   D   K   Q   K
                                          1        Sau 3AI
CAA CTC CGG GTT ATC AGC TTG TTC GAG CAT ATG ACC TCG ATC AAC  1249
 Q   L   R   V   I   S   L   F   E   H   M   T   S   I   N
                 10                                      20
             Xho I
ACC CCT CTT CCT CGA GAT CAA ATC GAC GCA CGT CTC CAC CAT CTC  1294
 T   P   L   P   R   D   Q   I   D   A   R   L   H   H   L
                                     30
GGC AGA CTA CCG CAG GGC GAG CTC TTC TCC TGC TTT CAC GAA GAA  1339
 G   R   L   P   Q   G   E   L   F   S   C   F   H   E   E
                 40                                      50
GAT TTG GAA GAA GCT ACC GAG CTC TAC AAA ATC CTT TAC A        1379
 D   L   E   E   A   T   E   L   Y   K   I   L   Y
                                     60
GTAAGTCTCATGTCATGTCTACAGTGCAATCTTTTCCCGTTTTCCGAAAGCAGTATTTTA 1439
              Hinc II
TTTTTGCTTTTTACGTTAACAGATAACACTTAAATTAACATCACGTATATTAATCTTTAC 1499
TATCAGTCGGTCCTGGATATCTAGCGGAGTTACTTGACGAAAAACTTTTTTTTTTTATCT 1559
                                   Eco RI
TCTAAATGCTAAGTAAAAATACTTTGTTCAGTTGAATTC 1598
```

Abb. 52: Nukleotidsequenz des UK Hc 1E/S1,46 mit 1. Exon für die Hc UEe;
die von der DNA-Sequenz abgeleiteten AS sind im Fettdruck dargestellt; Unterschiede zur proteinchemisch bestimmten Aminosäuresequenz sind mit □ markiert; wichti-

ge Sequenzmotive wie TATA-Box und CAAT-Box sind schattiert; ↱ = möglicher mRNA Startpunkt; im Exon sind die Nukleotidsequenzen des Hybridisierungsbereichs mit dem Oligo "e"-Nukleotidgemisch schattiert;
Erkennungssequenzen der Restriktionsendonukleasen sind unterstrichen.

```
  Sal I    Sau 3AI
  GTCGACG  GATCGACATTCAGCCATCTGGCAACGTCCACCTGTCTTTGTCCCGCTTCG 50
AGTCGTCCTGTCGCGCGATACCGTAATTCCACCGGTAAATGCTGTCTCGAACTCATGTTC 110
ACACAATGCCTATCTCGGATTCTTTACGTCGCCCGTTCCGCGCTGACTAGCAATGCCCTG 170
CGTAACAGCTACTTTTAAGCGGTCGCTCATTTGCATACTTCGATGCACGCGCACCGCATT 230
TGCATATCATACATCGATGCTGTCTGGTTTGCCCAGTAACATATGCAAATTTGGCGCATT 290
TTGACTGATTTTGAGCGGAGTTATCGCGTTTTTTCACTTTGTTGCTTAATTTATGGAAAC 350
CAGTGTACTTGGTGTGTTCAAAGAAGCAGTTTTGCTTCTGAATTTATTGGGAACGAATTA 410
TGTGAGGTAAGTAGGAGTTTCGTGTCTGGAGGACAAAGTGCTGCTGAAAGATGAGTAACT 470
  Hinc II
ACGTCAACAAAGGGCATCAGATTGGATTAAATAGCTGAGGAATTAACAGCACATTCCTAA 530
                                Hind III
TATTTCACGATGAACTGATATACAAGCAAGCTTTTGGTCTTGTTGGTCTTGACTGTGTAA 590
CTGTATGGGAAGGGCTTACGACCTGCACGTTTTCCGTTACCACTCTGACAAGGTATCAGT 650
                 Bam HI
CGGGATGAAATCCTGGATCCCTATGAGAGACTCTCCGCAGCGGCAGTCGGTCCGTATTTT 710
TCTTTTCATGGACGACAATGCTCTTCCCCACAGAGCGCGACTAGTGAAGAACTACCTTCT 770
GAAAGAAGCTACAGAAATCATGATGTGGCCAGCGNGTTCCCCATATCTTATTCCCATCGA 830
                                                        Pst I
AAAATTTTGGGAGTCCCTCAGAAGAGCTGTCTCAGCCAGCCAAGACCATCCAAGAACTGC 890
                                        Sau 3AI
AGACAGCTCTGTAGCAATTATTGCATTCTGCCGCTCTGGATCATTGACCGAGGGGATGAA 950
TCGTCGGTGCCAAGAATACTTTAAGTGTGTTTCAGATTCTTCATGAATTTTCGAAATCCT 1010
GCACTATTTTTAATATTTTGAAGATGAGATAGTATAAGGAAATACATATTTTTTAATGGT 1070
TAATACAGGAAGCGATAGCAAACAACTGATGTATTATATCAGGTGACAAAAAAGGCTCCA 1130
Sau 3AI                                        Hinc II
GATCAGCATCCACAGTGATGTATTAGAAACGGAGCTGTTGGTGAGTCGGTCAACAGAACT 1190
                                Pst I
TAATCAGACGTCGGTCAGATTATAAGCTGCAGAGGCTTACTAAGGCCGGTTTTCTTTACA 1250
  Sau 3AI
TGGATCATAATAGGACCTAAAGCATCCAATCCTTCAGTTACGAGANAAATTCTGAAACGA 1310
ACTTTTTTTTTTCAG/ CT GCA AAA GAC TTC GAT GAA GTG ATA AAT CTA  1357
                  T   A   K   D   F   D   E   V   I   N   L
                     65                      70
GCA AAG CAA TCC CGG ACT TTT GTG AAT GAG GGA CTT TTT GTT TAT  1402
 A   K   Q   S  [R]  T   F   V   N   E   G   L   F   V   Y
                     80
                                     ★
GCC GTC TCG GTT GCC CTT CTC CAT CGA GAT GAT TGC AAA GGA ATC  1447
[A]  V   S   V   A   L   L   H   R   D   D   C   K   G   I
 90                                      100
GTC GTA CCT GCC ATT CAG GAA ATC TTC CCC GAT AGA TTC GTA CCA  1492
 V   V   P   A   I  [Q]  E   I   F   P   D   R   F   V   P
                    110
ACG GAG ACA ATC AAC TTG GCT GTC AAG GAA GCA GCT AAT CAT CCC  1537
 T   E   T   I   N   L   A   V   K   E   A   A   N   H   P
120                                     130
Sau 3AI
GAT CAA /GTAAGTACATTTTATTTCATTTTATAATATCCTTTTCAAAGTGGATGAGTT 1594
 D   Q
    136
```

```
ACAGTCCAAAAGAGGTTAGGCATATCAAATCAATTAAAAGTAAAGGTCCGAGATGTGTTT 1654
AACTGTTTTCTGGTAGTGAATTTGTTATTAAAACGGTGAAAATCGTCAATACCCGTGAAA 1714
        Sau 3AI
AATGTAGTGATCACTGGTCTCAAATAAACTTAATGTTCGTTAGATAGTATAGTATCTATC 1774
CACCTCAGTACCACTTGTGTCCTCCCATCTGTCATAGATTAAGGATTAACTTGAAATGCT 1834
                                                          Sau
AACTAAATGTACATAGGCCAAATCAACTTGAAAGGTGTCGTGTTTTGAACAAGTTGTCAG 1894
3AI
ATCAATTTTTAAATAAAATGTATAAAGTACAAACCAAACAGTATGTTCTCGTGTTTGGCG 1954
CCAATCCTATTGAACGAGAACTTGACTGCAATTAAACCACGAAAAAAATTGGGTGTTCCG 2014
CGTTATTTCAAGGCCTAGGGTTCTGTGCTGTGCAAAGAAAAATCTCTACTTCCTAAGAAA 2074
                                                 Hinc II
GAAAGAAAGGAATATAGTAGTCAAAACCAACGTAGTACACACTTCTGTAGTTGAC 2129
```

Abb. 53: Nukleotidsequenz aus dem Bereich des UK Hc 10X/S3,2, codierend für das 2. Exon der Hc UEe;
Unterschiede zur Basensequenz des cDNA-Klons pHC4e sind mit ★ markiert; die Nukleotide der Sal I-Schnittstelle (schattiert) stammen von λ-EMBL3;
sonst wie Abb. 52.

```
GTCTTCGCAATGGCGGAAGTCACTGAGCTTTATTTTCATGAGTTCCTCTGTACCGTTCGA 60
TGATTTATTCCTAATTCACATCAGTTTCATACACTTCCGTTTGGTAAATACCCAGTGCAA 120
TAATGTGTTAGGACTATGAATATAAATATTTGTTCCTATTTTTTCCTATAG/ GAC ATT 177
                                                      D   I
                                                     137
TCT GTA CAT GTT GTT GAA ACT GGA AAC ATC CTC GAT GAG GAG TAC  222
 S   V   H   V   V   E   T   G   N   I   L   D   E   E   Y
    140                                     150
AAG TTG GCT TAC TTC CGT GAA GAC GTT GGC ACC AAC GCT CAC CAC  267
 K   L   A   Y   F   R   E   D   V   G   T   N   A   H   H
                        160
                                            Bam HI
TGG CAC TGG CAC ATT GTC TAC CCA GCC ACA TGG GAT CCA GCT TTC  312
 W   H   W   H   I   V   Y   P   A   T   W   D   P   A   F
    170                                     180
ATG GGG AGG ATG AAG GAC AGA AAA GGA GAA TTG TTC TAT TAC ATG  357
 M   G   R   M   K   D   R   K   G   E   L   F   Y   Y   M
                        190
CAC CAA CAG ATG TGT GCG AG /GTAAGTCCAAATTTCGAATGTCGCTTTAAAAG 409
 H   Q   Q   M   C   A   R
    200
TAGTAGTCGTAAGCTCGTTCCTCAAAAGCTGCTTCCCTTCCTAAAAGGTTTAGGCGATAT 469
CTTGAAAAAAATACATTCTCTACGAGATTTTCGTTGATTGAGTAGGAATGGGAANNAAGG 529
GAGCCAAATGAGCCGATGGTCGAACTAGGATAACAGCTACTAGAAAGAAAAAATACACGA 589
GGAGTGCAGTGTATGTATAACACGTAATTCTTCTCATGCATTTTAATGATACATATATAC 649
TCGTATATATGATTTATTCTCGCTTATTCGTTCTCCGGTTATCTCGTTTCCAGATTATCC 709
ATCACTACCATAAGTTAAGAATGATGGAACCATTTATATACAGAATTATTATGAGCATTT 769
       Xba I
AAATATCTCTAGA 782
```

Abb. 54: Nukleotidsequenz aus dem Bereich des UK Hc 10S4,1, codierend für die "Kupfer A"-Bindungsstelle;
Sequenzbereich aus der "Kupfer A"-Region ist schattiert;
Kupfer-bindende Histidinreste sind mit ○ gekennzeichnet;
N = nicht definiertes Nukleotid;
sonst wie bei Abb. 52.

```
Sal I                                                   Xho I
GTCGACAATAAAAAAACCTAACGCTGTGAAAACAATCTTTTTTTGCCTCGAGAGAAAGA 60
GGAGTTGTACCAATCGGCTGCCACCTTCACAGAAATTGTGAAGGTGCCAAGTGACGCAAT 120
                                          Eco RI
TCAGTGCGACGTGGGGAAACACTGAATTGCGTAACTTGAATTCACCCTCTATCTCTGCGC 180
                                   Hinc II                  Sau
AACATGAATATAATTTTTCGAAGTTTCACTTTGTTAACTCTCATCTCACGTACATTTCGA 240
3AI
TCGAATTTCTAACAATAAATGCATTTTTGTAACTCTAG /  G TAC GAC TGC GAG  291
                                            Y   D   C   E
                                          206
CGT CTG TCA AAT GGA ATG CGC AGG ATG ATT CCT TTC TCC AAT TTC  336
 R   L   S   N   G   M   R   R   M   I   P   F   S   N   F
210                                     220
GAT GAA AAG TTG GAA GGA TAT TCA GCC CAT TTG ACA TCC TTA GTC  381
 D   E   K   L   E   G   Y   S   A   H   L   T   S   L   V
                    230
AGT GGT CTA CCA TAT GCT TTC CGT CCT GAT GGT CTT TGC TTG CAC  426
 S   G   L   P   Y   A   F   R   P   D   G   L   C   L   H
240                                     250
Sau 3AI
                    ★
GAT CTG AAA GAC ATC GAC CTG AAA GAG ATG TTC CGA TGG AGG GAG  471
 D   L   K   D   I   D   L   K   E   M   F   R   W   R   E
                    260
AGA ATC CTT GAT GCA ATT GAC TCA GGT TAC TAC ATT GAC AAC GAA  516
 R   I   L   D   A   I   D   S   G   Y   Y   I   D   N   E
270                                     280
GGT CAC CAG GTA AAG CTC GAC ATC GTT GAT GGA ATT AAT GTC CTG  561
 G   H   Q   V   K   L   D   I   V   D   G   I   N   V   L
                    290
                      Hind III
GGT GCT CTC ATT GAA TCA AGC TTC GAA ACA AAG AAC AAG CTG TAC  606
 G   A   L   I   E   S   S   F   E   T   K   N   K   L   Y
300                                     310
TAC GGT AGT CTT CAC AAC TGG GGC CAT GTA ATG ATG GCC AGA TTG  651
 Y   G   S   L   H   N   W   G   H   V   M   M   A   R   L
                    320                     △
              Sau 3AI
CAA GAC CCT GAT CAC AGA TTC AAT /GTAAGTATGTTCATCGTTACTGAAATA 702
 Q   D   P   D   H   R   F   N
330                         337
                          Sau 3AI
CGTAAATACTTCTCCTTTTTCTTGTTGATCTTTTCAGTCTCATTGAAAAGGTTTATTTTT 762
TGACTATTCTTCTGTCCGTCAGTCCTAACTCACATGACAAAATTTCATGAACTACAACTC 822
AGACATGATAGTGATGGTTGCAGCGGAAGGATATGAACTGAAGAACAAAACGTAAAATGT 882
ACTCCAGTGTTCTTAAGAAATCGATATTAAATAATTTCGTATATCAGAACGATAGTGTGA 942
ACGCATAAAATATGCAACTGCAATAAAAACTTAAATGCGAAGATGAAGAAAGACACGAGA 1002
                                                Eco RI
TAAACATTGTGTTTAAATGCAATTAGAAATCGTCCTCAACGAATTC 1048
```

Abb. 55: Nukleotidsequenz aus den UK Hc 10 S0,4 und Hc 15H1,1E/H0,4, codierend für einen Teil der "Kupfer B"-Bindungsstelle;
Sequenzbereich aus der "Kupfer B"-Region ("Kupfer B"-Oligo, s. VOIT, 1987) ist schattiert; △ markiert einen zusätzlichen Lysinrest nach proteinchemischer Bestimmung; Kupfer-bindende Histidinreste sind mit ○ gekennzeichnet;
sonst wie bei Abb. 52, 53 und 54.

```
Eco RI
GAATTCCCTAGTTCTTTGGCCCAATTGCAGATAAAACCACAGACCCTGTAGAGGGACAGT 60
    Sau 3AI                                   Sau 3AI
TTATGATCTGGTACATTATGAGTTTTCCTATAGGTTTCTATGATCAATCCACAGTATTAA 120
AAAATTAATAATGGGTTCAATTCCAGAAGAATATGAGTCTGCAATATTTACTATAGTAGT 180
TTATTCTGTTGTGTTCAATTTGTGGTGATTACACAATGTGTGAAGTGCATTCCCACTTTG 240
TAACATAAATCCCCCCTAATTCAAGAAGCAAGGGAGATTCATAGTTTAGGAAACGGAAGG 300
GGCGGAGAGGATGATGGCTTAGTTCTTGAACTGAACTCTAGCGTTTTTCTTTCTTACGTC 360
CTGGACGATATTATGAAGAATACTTCACTTACCTGAGACTTCTGTATGCTTTTGTCACCT 420
GTATTTTTTGTCATCTGTCTTTTATACTTAGATTACCTGCGATTTATAAGTGTTTTAATC 480
ATTAGCTAATTGATGTCTTACTTGAGTTCAAGACTTATAATTCCTTTTACTACCTGTATT 540
                                                         ★
TTTTAG/ GAA AAC CCA GGA GTC ATG AGC GAT ACC TCT ACT TCC CTG  585
         E   N   P   G   V   M   S   D   T   S   T   S   L
    Sau 3AI     340                                     350
CGT GAT CCA ATC TTC TAC AGA TAT CAC AGA TTC ATC GAC AAT ATC  630
 R   D   P   I   F   Y   R   Y   H   R   F   I   D   N   I
                                    360
TTC CAG AAA TAC ATA GCC ACT TTG CCT CAT TAC ACT CCA GAA GAT  675
 F   Q   K   Y   I   A   T   L   P   H   Y   T   P   E   D
                370                                     380
GTAAGTAGTCCTTTATAACTGAAAATGTATGTATGTATTTCAGTGTCATCACNCCGACAA 735
ATTCTAATAGTATTTTAACTTCTCGTAAATTATTCAGGGTTAAAATATGTTTTAGTATGA 795
ATTGGAGACAACCACTAAAAGTTTTGCTTTTGTTATCCGAACTTATAAGACTTCAGTATG 855
AGAGGCAAAGGAAAAGACATTCTTATACTATGAGCTTTCAATAACATTTTCTGAAGAAAT 915
                          Hind III
AACAAACTGCCAATCACACTTTCGAAAAGCTT 947
```

Abb. 56: Nukleotidsequenz aus dem UK Hc 15H2,7E/H0,95, codierend für den 3. Histidinrest des "Kupfer B"-Zentrums; sonst wie bei Abb. 52, 53 und 54.

```
Sal I
GTCGACAAGAAATCATTGAATGAAAAATCAAAATGTAATGGGTGTGTGTGTGTGTGTGCG 60
TTTCTCTCTAGTCGCATGAGCTTCGTAACTTCGTGAAAAAGTTATGAAGAAAACCCGAGA 120
   Sau 3AI
GAAGATCATTTGTGGCTGAAGCAAATCAGTACTTTAAAAGATGTAAATATTGCTGAATTT 180
GGCGGTCATTAAACCTTAGGAAAGGAAGTTTATTTTGCTTTCGTCATCTATGTGATGTGA 240
TATATAATACTATGTCATACATAAGAGTTAAGTAAAGATTTAAATGTGTTATCGTTGGTG 300
ATAGAAAATTTAGGGTAACAGGAAATATTTAAATATTTATTTTCTTTATCATCCCATATC 360
ATTCCCAAGTGTTATCAGCCTAAGAATCTGGAGAGCTATACTCTGTCGCTCTTGTACAGT 420
GTAAGTTTCCGCTGTCTGCTTTTTCTGTTTCCACTGCTAATCGTTATGTAAAAACTTACG 480
GCTTCTTTTTCAGATTTCAGATTTGTACCGAATGTATTGAAAAGCGCTAGACGTTTCGTA 540
CATCTGTTGCGTTTCGTGATTTCGTCAAGAACTTGTTTTCACCTGTCTTGACATCTATGC 600
                                   Hinc II
CTTCGTTTTCATTTATATTTTTTTTCATCCGCAG/ TTG ACA TGT CCA GGA GTT  652
                                     L   T   C   P   G   V
        Hinc II                     381                 ★
CAC GTA GTC AAC GTA ACA GTG AAT GCC AAG GTT CCA AAT GTA GTA  697
 H   V   V   N   V   T   V   N   A   K   V   P   N   V   V
            390                                     400★
ACA ACT TTC ATG AAG GAA GCT GAA CTG GAA CTC TCA TAT GGT ATC  742
 T   T   F   M   K   E   A   E   L   E   L   S   Y   G   I
      ★                         410
GAC TTT GGA AGT GAC CAT TCT GTG AAG /GTATTTCTGCTTATGCAAATATA 792
 D   F   G   S   D   H   S   V   K
            420                 425
AATTAACTGTAAATTATATAATTGTGTTCTTTTGCTTTATACTGGAACGTACATACATTC 852
```

```
GTTTGCTTTAAAACAACCAATCATTCTTTCGCAGAAACACACTAGTGGAAATCAAAATTG 912
GTACACCCAGAAGGAATTGGTGGAAAGTCATGCAGCTTGGGAGATAGGTACAGGGTCATA 972
CCCTGAATAAATGGTCACAAAATGAAAAGAATCGCACCTCATGTCTGGCCGTCAGGTACA 1032
TTTTACAGTAAGAAGTGTGTCCACTTTGAGCAGCTATACACTGCTGAACTCATGCCGGCA 1092
TGGGTTCAAAATGTGTGCGGATGTCTTGGGGCATGTCTCCCCATGGCTGCNCGACTTGTG 1152
CTGTCAGCTTTTGTTCTGTTTGAGCTGGGAGACCATGAGTCATAATGCGTCTACCCATGC 1212
ATCCCAAATAATACTCTATCGGCGAGAAATCCGGGGACCGCGCCGTCCAATCCATCGTTG 1272
                                   Pst I
TGACACCTTGCAAGGCTAGTCTTGTAATGGCTGCAG 1308
```

Abb. 57: Nukleotidsequenz aus dem UK Hc 12S3,7S/P1,3, codierend für das 6. Exon;
grau hinterlegt sind die alternierenden Deoxypurin- und Deoxypyrimidinnukleotide;
sonst wie bei Abb. 52, 53 und 54.

```
Hind III
AAGCTTGTTTTAAAATGCTAAATACTGTAACACTCTCTAAGTTTTCGCTGAGATATTCAA 60
TGACCTCAGTATCACATTGTTCTGTAAAGATTGCATTACAGCATTTTTATCACGAAGTCA 120
TAAGCGAAATGTGGAATTATCTTAAAAAAGCGCTATTTTCTGTATTTTCTTCCGGCGTTT 180
CGGCGAATGCAAATACAGTTTGACGGACGCAACCCAAGGTGTTGGTGGTCCAACATGGAC 240
AAAAATGTTGTCTGTTCAGTTTAAATTAACTCTGTGACCTGAGAAAAAAAAAGCCTCATG 300
                                        Bam HI          Sau 3AI
GGTAGTCTATGTAAGGCACCTGTCCCATTGCAGAGGATCCGAGTTGGAGTCCCGATCGAT 360
GGCTACATTTTTCAAGTCTACTAAACATTAAATAGCACTGATAACAGAACTTACAGGGAA 420
                                            Sau 3AI
TTAATAAGCCAAAGTACTACGGAGTCATATATTTGCAAGGATCTATAATTTCCGTCAAGA 480
AAAGAAACGAATTGTCTTCATTAATCGAGCTATTCATTTCATTTGTAAGCTCTCCATAAC 540
TAAAATTGCTATTTCTAGAAAATACAGAAGGTCAAGGGTCAGAGCACTGTTTTTAGAGTT 600
TTCTGATAGACTCCGAGGAATTTTAAACTAGTTTTAAACTGATCCTATAGCTCTGGAATT 660
TTAACCCAGGATGGCGGCTGATTTCGGGGGTGGTAACTAAAGTTCTGGTGTTCTTATGTC 720
TTTCATAAGAGGTCCAGAAATGCAGCGGAAAGCGTCATAAGATTCATGTTTTAAAATTTT 780
TAATATTCTTTCAGTTTGCAGCTTTTTACATCATCAAGAAACGTCTTCAGATTAAAGGAA 840
TTAAATTAAAATTCAATTGTATTGACACTGTTTTCAAGTGCTTTTGACCTACTGCGTGGT 900
AACTATCGAATTACCAGTAATTATTAACACGTATTTATTAATTCTATTCTGGAGTACTTA 960
TTTTCATAAACAAAGTTACACACACTCTTTATTTAGCCATTCACCTTTCGTTTTCCTTTG 1020
GTTTAACTAAACTTGCAAGAAAGTCTATTTTGTTCATTTTACAG /  GTA CTG TAC  1073
                                                 V   L   Y
        ★       Sau 3AI                         426
CGC CAT TTG GAT CAC GAA CCC TTC ACT TAC AAC ATC AGC GTC GAG  1118
 R   H   L   D   H   E   P   F   T   Y   N   I   S   V   E
    430                                     440
AAC TCA TCT GGT GGT GCT AAG GAC GTG ACA ATG CGT ATT TTC CTC  1163
 N   S   S   G   G   A   K   D   V   T   M   R   I   F   L
                            450
GGC CCT AAG TAT GAC GAA TTG GGC AAC CGT CTG CAA CCA GAA CAG  1208
 G   P   K   Y   D   E   L   G   N   R   L   Q   P   E   Q
    460                                     470
CAG AGG ACC CTG AAC ATC GAA CTG GAC AAG TTC AAG GCC ACT C /  1251
 Q   R   T   L   N   I   E   L   D   K   F   K   A   T
                            480                     487
GTATGTTAAGCGTCCTAGATTCTTTTAAATGCATCACAAAGTATTTACGGGAGAAAGTCA 1311
AAACAAATTGAAACTGGTGTCCCCCNNCACACACACACACACGCACACACCAAATTGCTC 1371
TTTTTTTCAAATTAATTGCCATTATACTTGCTGCACCTTTGTCAGCCCATCTGCCAGTCA 1431
```

```
            Pst I
TGGAAAACATACTGCAGACCATCCTTTGTGACGTCTTTTAGGATTCCTTCCGACGCTTTG 1491
ACCAATGATGTTGCTCGGAAATGTGTTCCCCGTAGCTTGGACTTCAGTTTCGGGAAACAA 1551
GAAAACGCCCAAGGTGCCAACACAGGGCTGTAAGGAGGGTGAGGTACACATGAAATATTC 1611
                                          Sau 3AI
CTCTTTGACAGAAATTCTATGACAATATTGGTGACGTGTGATCTGGTACAGAATACCTTG 1671
                                                   Pst I
TACTGTCTGAAAGCCTTGGCTGGAAGCAAAGCTGCATCTCCGTATGGCATCTGCAGCAGC 1731
AGAAAATCCACCGGAGCTGATTTCTGTAAACGGACACAAAATTTTAGTGCTGTGCGTCGT 1791
TCCTAACGACTAAAGTCCTCCAAGACTTAGCACAGCCTGGTTGGCAGGCAACAAGTGATG 1851
TCAGTTCTACGAGCTACACCGCACATAGATATTCTGCTGTTGCCATTCCGCACAAGATAT 1911
TCTTCAAACTCTTTAAGCAAAATTAGTCGAAGAGACGTGCTCTGCATGCGACATAGCCAC 1971
AGGCCTTATTTACCGCAGTTTCTGTAAACAAAATTTCGGTCTTAATTTGTTTTGACTTGA 2031
CTACGTATAACCACACTTACGTCTAAATGTTCAAGCATAGCCAGTTTATCTATGGCAAGT 2091
TAAACTGCTTACAGAAAGTTAGGAATATTGCAGAAAAAAGTGGAAAAACTTCGCTAGACC 2151
TTGCAGCATGTATTGAAATGTTATCAGTGAGCGACACAAAACACATTATTTGAAATGTGA 2211
CTGGGGAAAAATTTTATTCCTCTTAGTGAGTAGGGAATAAGTGGTAGCATGTCGAAATGA 2271
           Hind III
TAAGGTTGGAAAGCTT 2287
```

Abb. 58: Nukleotidsequenz aus dem UK Hc 4H2,3, codierend für das 7. Exon;
grau hinterlegt sind die alternierenden Deoxypurin- und Deoxypyrimidinnukleotide;
sonst wie bei Abb. 52, 53 und 54.

```
                          SaI I   Sau3AI
                          GTCGACG GATCTCTCTTTGAGAAGTAACCATACCT 28
GCAACTCCGGTAATAAAAAAACCCAGTTTGTCCGTAAAAACCAGTATGTGACTAGACTTA 88
TCTTCAGGACAGCTTATGTACTTTCTTCATGGAGCTGCTTGGTACTAAAGTCTATTAAAG 148
              Hinc II
ACCAGTTGCTTTTAGTTAACTTTTTTTATGTACTAGTATTTTATCTTTCATCCCGAGATA 208
CCCCTAGTTTNANNTGCTTTATTTTTAGCTAGCGTTGCACCTATAAGAAATTTATTAAAT 268
TATTAGAAATGTAATAAATNNCGAAACTTATATTTCTACTGGACACACATGCTGTTGTAA 328
ATGTTTCCAGTAGAAATAAAAATTGGAGGANTCTTCTGTCTTAAGAAATGTAATTTAACT 388
TAACATGTCAAATTTCGTAAACTTAGCTGAACCATAGCATTATATAACTATTAAATCGTA 448
GTAATTATGCNNNAAAATCCGATTAGATTTCAGTAAAATAGGGTAGAAATGTGTGTGCAG 508
AGGCTTTAGTGTTACGGATTCTTAAAATCTTTCCTCTTACACTTCTAAACTCTTATAGTA 568
AACATCTATCTCTATATATGCAGAATTATCTTTACAGCCAAATTTTTATTGTGTTAATAT 628
TAAACATATAAAAATAATTTTGACTTTTATATACAATGCAAATTCATATTTTATTCCGAA 688
ATTTATACTAAACAGAAAATTAAAAATTACCTTGTAAAAATATTTGTGTATAGAGAGATA 748
CATTTCTACTATAATACCATAAATGCAGAACCGTAGATTGATTGGAACGCGTGCCGTCTC 808
```

```
                                                    Sal I
AAAAATATGAAAATGAGTAAAATTTTTCCATTTTTTTTTATTTCAG / TC GAC CCT   862
                                                L   D   P
                                                          490
GGT AAG AAC GTC GTC ACA CGT GAC CAC CGT AAT TCA ACT GTA ACT   907
 G   K   N   V   V   T   R   D   H   R   N   S   T   V   T
                                        500
GTT GAA CAA AGC GTC CCA GTA AAG AAA CTG CGT GAG GAA GGA GGC   952
 V   E   Q   S   V   P   V   K   K   L   R   E   E   G   G
                     Pst I                                520
GTT GCT GGA GAA TAC TGC AGC TGC GGA TGG CCT GAA CAC ATG CTC   997
 V   A   G   E   Y   C   S   C   G   W   P   E   H   M   L
                                        530
ATC CCC AAA GGA AAC CAC AGG GGC ATG GAC TTC GAA CTC TTC GTC  1042
 I   P   K   G   N   H   R   G   M   D   F   E   L   F   V
                     540                                  550
ATT GTA ACA GAC TAC GCT CAG GAT GCT /GTAAGTGCTATGTCGTTTTCTCT 1092
 I   V   T   D   Y   A   Q   D   A
                                559
ACGAAAGTGTGGTTTCTAATATCTCTTAAAGGTTTCCCAGAGGTTACTTGCAGTTATGTT 1152
                                                     Sau 3AI
TTCTGTCAAAACACCAAAGGGTGAACTTGGGTTGAATAAAAGAAGAAAGGTCGATCGGAG 1212
TGGAGAATAAGATTTGGAATAAGGTAACCACATTTAGTATAATCAACCTAAAAATGCAGT 1272
TCAGATTGAAAACATTATACTACATAAAGTGTATGTAAGAACACTGCAATTAATATCCAA 1332
TTTTCAATTAATTCAAAGCGTAACTACCATTGCTTTCACAACATTTTAACTTCTTCAGGA 1392
GAAGTACAGGCTGAGACTTCACGTCTTCGTCTTGGTGCATAGGAATTTTTTGTCATCGGC 1452
                     Eco RI
TAGTTTTAAATGAGCTCATGTCGAATTCTGTTATTCACCATGAGTTACTATAGTAGCTGT 1512
CGAATTAGTAATGGTTAATAGTAATTGTTCATTTATTATCACTTCTACAGATATTACTTA 1572
ATAGAAATGGTAATTCCATAATATGGAAAGAAATATACCTTTCACCTATGCACTATTCCT 1632
ACGTGCGAACTCCGACAGCCTGTATTTAAGCGAACTTTTGTGCTGCGTATTCTGCGAGTC 1692
TCAAAGGTTTGTAAGGCACCTCTGGAGAGGAGAAAGATGGAGACGTTGGAGAAAAGGTTG 1752
TAGAAATTAGCCTTCTTTTGTTGCCTGTCACGTTGGACTCGAACTAGCATCTGATGGCTC 1812
            Sau 3AI
ATGAACCAGGCGATCAATCCACTTTAACACTGGGACATTTGCACCAACTAACATCACCAT 1872
CTGCCTCTTCTCCGTGAATCGTACAAGTGCCGGTTGTCTAGTTGTGATTCGCGAACCGTG 1932
  Sau 3AI
TGGATCTGACCCGAACAGCCTGGGTTACATAAGGTGAAGGCAAATTCACACAGGTTTCNT 1992
GTCACAATTACTAATAATAGCCTTATATCTGGTACATAATAAGAACAACTTTTATGTAAT 2052
AATAAAGCTAGTATTGTGTTTTATACACGCACCTAAATTTGCTCCTACTAAGCATAAGCA 2112
GCCCGATTTTTTGTATCCTAATTGAACGTTTCCCTTATGACCGATATACTGCACATAGAG 2172
GTGATTGATGTGCATTTCAAGGATTTACTCCATTCCCTTATAGAGAGAATATGCCTATGT 2232
GTTATGGAATTAAATTGTCTTCGCACAAATGCTTAAATAAAAATTCTATGTATTCAACCT 2292
GTGTCTGGGGACAAATCGTATGCACGATGCTGATGACAAGGAAATGATTTCAGTTACGTT 2352
GTCAAGAAAACTCCTTGACCAGAAGGAGTTTTCTTGGGACTTGCAAACGTACGCCTAAAA 2412
    Sau 3AI
GCTGGATCTTGTAAGGTTGATAACAGTTATTGAGATAGACACAAGGATAAATTTTAAACT 2472
       Hinc II
TCCATGAGTTGACCCGAAACCGAAAGGTGCTGTTTCTACAAAAAGAAACAGAAGCAATCC 2532
CTGTTATGCTTCAAATGATGAGGAAATCTTCTCGTAATGCACTTTTTCTTCATACACAAA 2592
                                                    Hinc II
ATGTGTTTACTACACAGAGCACCCCCCCCCCTCCGGCAAATGAGTGTCAACTTTCTGTAC 2652
CATATACGGAAACACTGTTGATGGGTGAATAAAACAGTTATTCCTCTAGTAACGCACGGG 2712
ATATAACCTTTAAAAAAACAATAAAACGGTCACTTAAGTGTCTTTGTTTTTTTAACAGAA 2772
TACGTAAAACAATCGCCGTTGAGGGACGGTTCTATTTGAAGATGGGTATTTTTAGATTCT 2832
GCGACTCCGTAATATATGTAATAAATGTATTTAACCGTGTAGGTGGAATATAAGGACAAA 2892
TTTTCTTAGTTTTGTTTTCGGATTTCCCTGCATTTGTATTAAATCCTATATAAGAAAGGT 2952
TTTAATTAACTAATCCACCCTTATAAAAGACGCCACTTAAAAGAAATTAATTTGTCATAT 3012
```

```
 Sau 3AI
GGATCTCATTTTCCTAGGATTACGTGATAATATGACCAATTTGTCATGAGCGGTCTGCGC 3072
TATCACAATATTGTAGATATTTACATTATTAGAAGGAATACTGTGTAAAGGCTCTGGCCG 3132
TATAAAGCCACACATGGAGGAATCCATGTAGAGCCACTTCGGCTTGATTTTTCCTCCTAT 3192
TATGCCTTTTATTTGTAATATTCTTTTTCCATGTATTAACCTATTTGTTTTGATATAATA 3252
                                                      Pst I
AACTATTACTATGAGAAGGCTACATGAACGTGGTAATAGCTCAGCGGTAGACTGCAGCGG 3312
AAAGGTCCCGGGTTCAATTCGCCGTTGCTACAATTAGCGCCCGAAAGGTGGACTCCCGAA 3372
ATGACTCCCGATTGTGACTTACCCTTAACTGAGTGAACTGGTATGTTTGGCTGGTTATCT 3432
GGCATGATAGGTGAATTGTTCTGAGCTGTTGTAGAAACTGAAAAAAAATGCTGTGGGGAA 3492
AGATGTAAAGACCCTGGACATATAAAGCCACACATGAGAGGGCTACATGAACGTGGCAAT 3552
                         Pst I
AGCTCAGCGGTAGAGCATTCTGCTGCAGTGCAGGTCCCGGGTTCAATTCCCGGTTACTAC 3612
AACTGTAAAAGGGATTTTATGCGATTTTAAGCAGAAAATTTTTAAGGAAGTTTTTTTTCT 3672
TCTTTTTCTTATTAAATAATTTTCAAAATCATTTCGCAAAATTAAGAATTTGTGAAAAGT 3732
GTTAATAACATAGAATTTTAGCTTGGTTTGTCACTCTTATAAACAAGTGATTTTCTTCTT 3792
         Hinc II
TCAG /  GTC AAC GGA CAC GGA GAA AAT GCC GAA TGT GTG GAT GCT  3835
         V   N   G   H   G   E   N   A   E   C   V   D   A
         560                                     570
GTG AGC TAC TGC GGA GCC AAG GAC CAG AAG TAT CCT GAC AAG AAG  3880
 V   S   Y   C   G   A   K   D   Q   K   Y   P   D   K   K
                             580
CCC ATG GGA TTC CCA TTC GAT AGA GTC ATC GAA GGA TTG ACC CTT  3925
 P   M   G   F   P   F   D   R   V   I   E   G   L   T   L
         590                                     600
GAA GAA TTT CTA ACT CCG AGC ATG AGC TGC ACT GAT GTC AGG ATT  3970
 E   E   F   L   T   P   S   M   S   C   T   D   V   R   I
                             610
AAG TAC ACC GAT ATC AAA TAG  ACACAGAAATCACTGAAGAAAGGATAAAAAC 4022
 K   Y   T   D   I   K  Stop
         620         623
AAAAGACCTTCTAAATTATCTCAAACTTTGCAGCAGCCTTCGCATACCTTTCAAAAATTA 4082
AAACGGAAGTCTTTTTACCTTGCCGCAGCATATCAAAACAAACGAAAATGTTCATCAGTC 4142
AGAATGTAAAACTTTTTAAAATTTCTAACACTGGCCTTTTTTTGTATAACTAACACCCAA 4202
TAGTTGTACAGATTTGTCATGTTTATGTACTTGGAATATTGTTTTACGAAGTGAAAAAAA 4262
                poly(A)-Schwanz
AAGTATTCGACAGAAACTGTTGTCTGCCTTTTGTAGAAGCATAATTATTCATCGGCAACA 4322
TTTTAGCGTTTTCAAATATCACGAAAGAGCGCTTTGCAATAGGACGAAGGTCTCCGTATG 4382
ACGGCCATTCGACCAATTAAAACGTACCGACAAGTAACTAAATATCGGCTTCTTATCTGA 4442
ACTGTCATATCATCACCTCACCTCATCCCCCTCCCCCTTTTTTAGAGTCACATTTCATCT 4502
          Hinc II
TTCCACACTGTCAACACTGGCACCTCTCGTTTGGGCCCTCACACACTGGCTCCCTGAGAG 4562
GAAATCCAGATGTTGGAGAGGTGAGAGTGTTAAAAAAAGGGTGGAGAAGGAAAAACGCGT 4622
GTTGGTGGGTGGGAGAGGTGCAGCTCGGCAGTGTAAAATTATGAGAAACGGTCCGATAAG 4682
CCTCCTCAAAAAAGTAAACCCGATACTGGCGAAGTCCCTGAAATAGAGTTGTTGTACACA 4742
CAGCATACCGCGTGACAAGAAAAGAAGAAAGACGAGCCTACCGTTACGACTAGAGTTTAA 4802
TTGAAATAAATTTAAAAAAAAAGAATTTATCCTGTGGAAGCTCTGTAACACAACTGAAAC 4862
TGAATAAGTAAAATGCACCATATGAAATCCTAAGCATTTACACAACATGAAGTATTAAGT 4922
                         Hinc II
ACATTTAGTGCACTTATTCACGGTCAACATCACGTCTGCACCTAACAGCGGACGACACAC 4982
TACTGGAACTCTCGGTTCCGGTTTGTTTTGCAGAAATACTGCTTCTTCTTCCAGTTCTTC 5042
                                                  Bgl II
GGGGTGGCGAGCACAGCCTCGAAGCGTGTGAATTTGTTGTGATTGTAGATCTGAATGCAG 5102
                                                  Bgl II
GGATGATGTGTCGGCTTGTACTGGAGGGATGAGGTGACGGATGTTCAGATCTTAGAAGGA 5162
```

```
                          Sau 3AI
TGATAGGATTGTGCCTCAGATCGATCAGAGACCGCGCATGGCATCCAGGCGATACCTGTG 5222
AGAGAGGGAATTACGGAATCCAGGTTTTTACAAACTAAATTACATGGATGAGTACCACAG 5282
CAGCCTTAGTTATCTTCGCTGGTCATAACCACCAGTATTCCGTACAAACGAAAAAAATTT 5342
CTTTNCNCTCAGTAGTGTGAATGAAAAAATCGTGTTGTCTTTTCGTTATTAGACTTTAAG 5402
TATTGTTATTGTGAAATAAGGCTTTTATTTAAGTAGTTGCCCTGCCAGTTTAATGGAGAA 5462
AGTATGCAAAGTTTCGAGAAAAATTTATTTACGTATAAATGTTCCCAAATGCAGTTGCAA 5522
TGGTGACAGTAATTCTACGCAGTTTCGAAACTGAGAACTCCAGATGAGTTAATCGAATAG 5582
TCCATAGTTTCCGGCAAAAGATGTTTTCTCATTTGCAATACAAACAAACTTGAAGTGCTT 5642
TTCACATACCTTGGTTTGGTAAGCTATGGTCGATTTGATGCCTTGAAAAATGTATTATCC 5702
CTCTTCTTTTACATCCTACCGGCTTCTGTACTCACTCTTATAGTCCAGAGAACCTAAGTT 5762
ACTCATAAGTCGTATAATTTACACAAGCTGCGTGCTCTGAACTCCAGAGTTTTAAATACT 5822
GTTCGGGGGAAAAAGTACTTTTCCCGTGATTCCACTTTATAAAGTAAGCTACTTATAGAA 5882
CAGAGATTCATAGTTTCTTGCTTGTTGCTTTCCGTGGGCGTGTACCATATTTCAACGAAA 5942
  Bgl II
TCAGATCTAAGAAAAACTTTAAAAACTGTTCAACTAAGGAAAACATGGTAATGTTTTGGA 6002
GAGTCATGCCGTCTGAAATGCAGATATCGAATCACATCTCAGTAATTAGTATTTTTTTGT 6062
                                Sau 3AI
ATGAAAGTACTTCTTGCTAATAGAGATAGATCATTTTAAATGTGTTCATTTCGCTAGAGA 6122
                                          Eco RI
CTTTTTCTTTTCAATAGGTGCTTAAAGTTTGGAAATGTGAATTC 6166
```

Abb. 59: Nukleotidsequenz der UK Hc 6S0,8, Hc 6E/S0,6 und Hc 6 E4,7, codierend für das 8. und 9. Exon; konservierte Sequenzmotive, die für das 3'-Splicing der pre-mRNA wichtig sind, wurden schattiert oder unterstrichen (BIRNSTIEL et al., 1985); ★ markiert das Ende der cDNA (s. VOIT, 1987); umrandete Nukleotide (GAAA!) stellen mögliche poly(A)-Schwanz Anfügungsstellen dar; sonst wie bei Abb. 52, 53 und 54.

D DISKUSSION

Sowohl Arthropoden- als auch Mollusken-Hc der verschiedensten Spezies sind hinsichtlich ihrer biophysikalischen sowie biochemischen Eigenschaften untersucht worden. Während bei den Hämoglobinen die zugehörigen Strukturgene inzwischen sehr eingehend analysiert worden sind, ist bisher über die genetischen Aspekte der Hämocyanine nur sehr wenig bekannt. Aufbauend auf den Arbeiten von VOIT (1984 und 1986), die durch die Charakterisierung eines cDNA-Klons für die Hc UEe der Vogelspinne E. californicum einen neuen Weg in der Erforschung der Hämocyanine einschlugen, war es Ziel dieser Arbeit, einen Beitrag zur Analyse eines Hc-Gens zu leisten. Im folgenden soll deshalb nicht nur zum ersten Mal die Struktur eines Hc-Gens vorgestellt werden, sondern auch die zugehörige Klonierungs- und Screeningstrategie diskutiert werden.

I Klonierungsstrategie

Mit der Etablierung einer Genbank wird die möglichst vollständige Repräsentation eines Genoms in der Form einer Sammlung rekombinanter (genomische DNA + Vektor) DNA-Moleküle angestrebt. Zwei Faktoren bestimmen die Wahrscheinlichkeit P, mit welcher ein bestimmmtes DNA-Fragment gefunden wird:

Die Größe der Insertion und die Komplexität des Genoms. Erstere Variable wurde durch Cäsiumchloridgradientenzentrifugation der zu klonierenden genomischen DNA-Fragmente im Minimum- und Maximumbereich eingeschränkt. Die mittlere Größe der Insertion von 10 durch Zufall ausgesuchter Klone aus der Genbank Eury IV wurde auf $1,4 \times 10^4$ Bp bestimmt. Angaben zur Komplexität des Genoms konnten nur aus zwei Quellen bezogen werden: FOELIX (1979) gibt für den diploiden Chromosomensatz von Spinnen 20-30 Chromosomen an. Speziell für Eurypelma californicum finden sich in der Literatur keine Angaben. Allein in der Arbeit von VOIT (1984) wurde der DNA-Gehalt von Hämocyten bestimmt. Er liegt bei 8×10^9 pg pro

Zelle und erreicht mit daraus errechneten 4×10^9 Bp pro haploidem Genom die Komplexität von Säugerzellen (SERFLING, 1982).

Die Zahl N der Klone, die ein bestimmtes Genom darstellen sollen, läßt sich aus folgender Beziehung bestimmen:

$$N = \frac{\ln(1-P)}{\ln(1-f)} \qquad \text{(CLARKE and CARBON, 1976)} \; .$$

P stellt die gewünschte Wahrscheinlichkeit und f das Größenverhältnis von Insertion zu Genom dar. Für E. californicum sollte eine Genbank bei einer Wahrscheinlichkeit von 99 %, einer durchschnittlichen Insertionsgröße von $1{,}4 \times 10^4$ Bp und einer Genomgröße von 4×10^9 Bp mindestens $1{,}3 \times 10^6$ individuelle rekombinante Phagen besitzen. Genbank Eury IV erfüllte diese Bedingung für eine erfolgreiche Suche nach einem Hc-Gen mit $1{,}5 \times 10^6$ Klonen. Da schon nach 6×10^5 durchmusterten Phagen das komplette Gen einer UE durch 8 verschiedene rekombinante Phagen (Hc 1-15) abgedeckt war, kann gefolgert werden, daß die DNA-Bestimung für Hämocyten wahrscheinlich einen etwas erhöhten Wert ergab.

II Screeningstrategie

Prinzipiell gibt es zwei Möglichkeiten, in genomischen Genbanken nach bestimmten Sequenzen zu suchen:

1) Auf Grund bekannter Proteinsequenzen können charakteristische Peptide in die entsprechenden Nukleinsäuresequenzen umgeschrieben werden, die dann nach radioaktiver Markierung als Hybrdisierungsproben verwendet werden können.

2) Ist ein für das Protein entsprechender cDNA-Klon isoliert worden, so kann dieser direkt nach entsprechender Markierung als "Sonde" in der Genbank benutzt werden.

Die erste Methode, das Screening mit Oligonukleotiden, wird hauptsächlich zum Durchmustern von cDNA-Genbanken angewendet [Bsp.: Ceruloplasmin cDNA: MERCER and GRIMES, (1986); Interleukin-2 Rezeptor: LEONARD et al., (1984); E. californicum Hc UEe:

VOIT, (1986)]. In der Literatur finden sich zwei Alternativen zum Screenen mit Oligonukleotiden: Entweder man hybridisiert mit einem einzelnen längeren (50-90 Bp) Oligonukleotid [Bsp.: Trypsin-Inhibitor: ANDERSON and KINGSTON, (1983)] oder man benutzt als Sonde ein Gemisch von kürzeren (17-27mere) Oligonukleotiden gemäß der Degeneration des genetischen Codes [Bsp.: 17 und 20mer beim Octopus dofleinii Hc: LANG, (1988)].

In Vorversuchen wurde mit einem 17mer Oligonukleotidgemisch (gemäß der hochkonservierten "Kupfer A"-Bindungsstelle ...-H-H-W-H-W-H-...) in der Genbank Eury IV 1 x 10^5 Klone nach der Methode von WALLACE et al.(1981) (s.a. B.II.11.4) durchmustert. Die Suche nach Hc-Genen war jedoch ohne Erfolg. Beispiele für einen erfolgreichen Einsatz von 2 oder 3 verschiedenen Oligonukleotidgemischen können aber in der Literatur gefunden werden: Das menschliche Erythropoietin-Gen wurde unabhängig von zwei Arbeitsgruppen gefunden (LIN et al., 1985; JACOBS et al., 1985). Mit zwei kürzeren Einzelnukleotiden konnten Interferon-Gene isoliert werden (TORZCYNSKI et al., 1984).

Erfolgreich dagegen konnte der von VOIT (1986) durchgehend sequenzierte cDNA-Klon der Hc UEe nach Nick-Translation eingesetzt werden: nach nur 6 x 10^5 durchmusterten Phagenplaques konnten 15 positive rekombinante Phagen isoliert werden, deren Genom nach Charakterisierung mit Restriktionsenzymen und Sequenzierung der Exons das gesamte Gen der Hc UEe abdeckten. Der Einsatz radioaktiv markierter Oligonukleotide beschränkte sich auf das Identifizieren des ersten Exons für die Transkriptionseinheit (s. C.IV) und des Exons für die "Kupfer A"-Bindungsstelle (s. C.II.2).

Da von VOIT (pers. Mitteilung) in der Zwischenzeit weitere cDNA-Klone für andere Hc-UE gefunden wurden, ist für das Auffinden weiterer Hc-Gene die Verwendung langer cDNA-Klone die Methode der Wahl. Man schlägt damit gewissermaßen zwei Fliegen mit einer Klappe: durch relativ kräftige und eindeutige Signale wird die Suche nach den weiteren, vermutlich ebenfalls riesigen Strukturgenen verkürzt, sowie die Chance auf deren möglichst vollständige Charakterisierung erhöht.

III Verleich der Exonsequenzen mit cDNA- und Proteinsequenzen der UEe von Eurypelma californicum

In der Arbeit von VOIT (1987) wurden durch Sequenzierung der cDNA-Klone pHC4 und pHC393 88 % der für die Hc UEe codierenden Nukleinsäuresequenzen ermittelt. Die restlichen 5'-terminalen Sequenzen (entsprechend 73 AS) konnten durch Exon 1 und teilweise Exon 2 abgedeckt werden. Weitestgehende Übereinstimmung zeigt ein Vergleich genomischer mit cDNA-Sequenzen, sowie deren Umsetzung in Aminosäuren (SCHNEIDER et al., 1983) der Hc UEe (Abb. 60):

```
CCG GAC AAA CAG AAG CAA CTC CGG GTT ATC AGC TTG TTC GAG CAT ATG ACC TCG ATC AAC ACC CCT CTT CCT CGA GAT CAA ATC
 P   D   K   Q   K   Q   L   R   V   I   S   L   F   E   H   M   T   S   I   N   T   P   L   P   R   D   Q   I
                                     10                                      20

GAC GCA CGT CTC CAC CAT CTC GGC AGA CTA CCG CAG GGC GAG CTC TTC TCC TGC TTT CAC GAA GAA GAT TTG GAA GAA GCT ACC
 Dx  A   R   L   H   H   L   G   R   L   P   Q   G   E   L   F   S   Cp  F   H   E   E   D   L   E   E   A   T
     30                                          40                                      50

GAG CTC TAC AAA ATC CTT TAC ACT GCA AAA GAC TTC GAT GAA GTG ATA AAT CTA GCA AAG CAA TCC CGG ACT TTT GTG AAT GAG
 E   L   Y   K   I   L   Y   T   A   K   D   F   D   E   V   I   N   L   A   K   Q   S   Rx  T   F   V   N   E
             60                                      70                                      80
                                                     A
GGA CTT TTT GTT TAT GCC GTC TCG GTT GCC CTT CTC CAT CGA GAT GAT TGC AAA GGA ATC GTC GTA CCT GCC ATT CAG GAA ATC
 G   L   F   V   Y   Ax  V   S   V   A   L   L   H   R   D   D   C   K   G   I   V   V   P   A   I   (Q)  E   I
                     90                                      100                                     110

TTC CCC GAT AGA TTC GTA CCA ACG GAG ACA ATC AAC TTG GCT GTC AAG GAA GCA GCT AAT CAT CCC GAT CAA GAC ATT TCT GTA
 F   P   D   R   F   V   P   T   E   T   I   N   L   A   V   K   E   A   A   N   H   P   D   Q   D   I   S   V
                             120                                     130                                     140

CAT GTT GTT GAA ACT GGA AAC ATC CTC GAT GAG GAG TAC AAG TTG GCT TAC TTC CGT GAA GAC GTT GGC ACC AAC GCT CAC CAC
 H   V   C   E   T   G   N   I   L   D   E   E   Y   K   L   A   Y   F   Rx  E   D   V   G   T   N   A   H   H
                                 150                                     160

TGG CAC TGG CAC ATT GTC TAC CCA GCC ACA TGG GAT CCA GCT TTC ATG GGG AGG ATG AAG GAC AGA AAA GGA GAA TTG TTC TAT
 W   H   W   H   I   V   Y   P   A   T   W   D   P   A   F   M   G   R   M   K   D   R   K   G   E   L   F   Y
     170                                         180                                     190

TAC ATG CAC CAA CAG ATG TGT GCG AGG TAC GAC TGC GAG CGT CTG TCA AAT GGA ATG CGC AGG ATG ATT CCT TTC TCC AAT TTC
 Y   M   H   Q   Q   M   C   A   R   Y   D   C   E   R   L   S   N   G   M   Rx  R   M   I   P   F   S   N   F
             200                                     210                                     220

GAT GAA AAG TTG GAA GGA TAT TCA GCC CAT TTG ACA TCC TTA GTC AGT GGT CTA CCA TAT GCT TTC CGT CCT GAT GGT CTT TGC
 D   E   K   L   E   G   Y   S   A   H   L   T   S   L   V   S   G   L   P   Y   A   F   R   P   D   G   L   C
                 230                                     240                                     250
                     A
TTG CAC GAT CTG AAA GAC ATC GAC CTG AAA GAG ATG TTC CGA TGG AGG GAG AGA ATC CTT GAT GCA ATT GAC TCA GGT TAC TAC
 L   Hx  D   L   K   D   I   D   L   K   E   M   F   R   W   R   E   R   I   L   D   A   I   D   S   G   Y   Y
                             260                                     270                                     280

ATT GAC AAC GAA GGT CAC CAG GTA AAG CTC GAC ATC GTT GAT GGA ATT AAT GTC CTG GGT GCT CTC ATT GAA TCA AGC TTC GAA
 I   D   N   E   G   H   Q   V   K   L   D   I   V   D   G   I   N   V   L   G   A   L   I   E   S   S   Fx  E
                                 290                                     300
```

```
ACA AAG AAC AAG CTG TAC TAC GGT AGT CTT CAC AAC TGG GGC CAT GTA ATG ATG GCC AGA TTG CAA GAC CCT GAT CAC AGA TTC
 T   K   N   K   L   Y   Y   G   S   L   H   N   W   G   H   V   M↑M   A   R   L   Q   D   P   D   H   R   F
    310                                     320                 K                   330

                                                    T
AAT GAA AAC CCA GGA GTC ATG AGC GAT ACC TCT ACT TCC CTG CGT GAT CCA ATC TTC TAC AGA TAT CAC AGA TTC ATC GAC AAT
 N   E   N   P   G   V   M   S   D   T   S   T   S   L   R   D   P   I   F   Y   R   Y   H   A   F   I   D   N
            340                                     350                                     360

ATC TTC CAG AAA TAC ATA GCC ACT TTG CCT CAT TAC ACT CCA GAA GAT TTG ACA TGT CCA GGA GTT CAC GTA GTC AAC GTA ACA
 I   F   Q   K   Y   I   A   T   L   P   H   Y   T   P   E   D   L   T   C   P   G   V   H   V   V   N   V   T
                    370                                     380                                     390
                                G                                                   C           C
GTG AAT GCC AAG GTT CCA AAT GTA GTA ACA ACT TTC ATG AAG GAA GCT GAA CTG GAA CTC TCA TAT GGT ATC GAC TTT GGA AGT
 V   N   A   K   V   P   N   V   V   T   T   F   M   K   E   A   E   L   E   L   S   Y   G   I   D   F   G   S
                            400                                     410                                     420
                                    C
GAC CAT TCT GTG AAG GTA CTG TAC CGC CAT TTG GAT CAC GAA CCC TTC ACT TAC AAC ATC AGC GTC GAG AAC TCA TCT GGT GGT
 D   H   S   V   K   V   L   Y   R   H   L   D   H   E   P   F   T   Y   N   I   S   V   E   N   S   S   G   G
                                    430                                     440

GCT AAG GAC GTG ACA ATG CGT ATT TTC CTC GGC CCT AAG TAT GAC GAA TTG GGC AAC CGT CTG CAA CCA GAA CAG CAG AGG ACC
 A   K   D   V   T   M   R   I   F   L   G   P   K   Y   D   E   L   G   N   R   L   Q   P   E   Q   Q   R   T
    450                                     460                                     470

CTG AAC ATC GAA CTG GAC AAG TTC AAG GCC ACT CTC GAC CCT GGT AAG AAC GTC GTC ACA CGT GAC CAC CGT AAT TCA ACT GTA
 L   N   I   E   L   D   K   F   K   A   T   L   D   P   G   K   N   V   V   T   R   D   H   R   N   S   T   V
            480                                     490                                     500

ACT GTT GAA CAA AGC GTC CCA GTA AAG AAA CTG CGT GAG GAA GGA GGC GTT GCT GGA GAA TAC TGC AGC TGC GGA TGG CCT GAA
 T   V   E   Q   S   V   P   V   K   K   L   R   E   E   G   G   V   A   G   E   Y   C   S   CD   G   WK   F   E
                    510                                     520                                     530

CAC ATG CTC ATC CCC AAA GGA AAC CAC AGG GGC ATG GAC TTC GAA CTC TTC GTC ATT GTA ACA GAC TAC GCT CAG GAT GCT GTC
 H   M   L   I   P   K   G   N   H   R   G   M   D   F   E   L   F   V   I   V   T   D   Y   A   Q   D   A   V
                            540                                     550                                     560

AAC GGA CAC GGA GAA AAT GCC GAA TGT GTG GAT GCT GTG AGC TAC TGC GGA GCC AAG GAC CAG AAG TAT CCT GAC AAG AAG CCC
 ND  G  (H   G)  E   N   A   E   C   V   D   A   V   S   Y   C   G   A   K   D   Q   K   Y   P   D   K   K   P
                                    570                                     580

ATG GGA TTC CCA TTC GAT AGA GTC ATC GAA GGA TTG ACC CTT GAA GAA TTT CTA ACT CCG AGC ATG AGC TGC ACT GAT GTC AGG
 M   G   F   P   F   D   R   V   I   E   G   L   T   LF  E   E   F   L   T   PV  S   M   S   C   T   D   V   R
    590                                     600                                     610

ATT AAG TAC ACC GAT ATC AAA
 I   K   Y   T   D   I   K
            620
```

Abb. 60: Vergleich genomischer DNA-Sequenzen der Hc UEe von Eurypelma californicum mit cDNA-Sequenzen (VOIT, 1987) und mit proteinchemisch bestimmten Aminosäuresequenzen (SCHNEIDER et al., 1983).
Eingerahmte Codons und AS bedeuten Unterschiede zur Aminosäuresequenz nach SCHNEIDER et al. (1983); dort bestimmte AS sind kleingedruckt , fehlende eingeklammert; K nach Pos. 325 wurde nur proteinchemisch bestimmt; Unterschiede zur cDNA-Sequenz sind grau hinterlegt; die in der Arbeit von VOIT (1987) bestimmten Basen stehen oberhalb der Basen der genomischen DNA-Sequenz.

In 7 Positionen, das entspricht 0,42 % aller verglichenen Nukleinsäuren (1653 NS), unterscheiden sich cDNA- und genomische DNA-Sequenz. 5 Punktmutationen gehören dem Typ der Transition (C/T Austausch), 2 dem Typ der Transversion (C/A Austausch, Abb. 61) an. Keine einzige der Punktmutationen in einer der möglichen Triplettpositionen (5 an 3., 2 an 1. Stelle) löste einen Aminosäureaustausch aus.

			Pos. Nr. der AS
2. Exon	CGA A	= Arg	98
4. Exon	ATC A	= Ile	259
5. Exon	CTG T	= Leu	350
6. Exon	GTA G	= Val	400
	GGT C	= Gly	415
	TTT C	= Phe	418
7. Exon	CAT C	= His	430

Abb. 61: Unterschiede zwischen genomischer und cDNA-Sequenz der Hc UEe von E. californicum;
grau hinterlegte Basen stammen von der cDNA-Sequenz (VOIT,1987).

Der Vergleich der aus den Nukleinsäuresequenzen abgeleiteten AS mit den durch proteinchemischen Methoden bestimmten AS kann sich auf die ersten 73 AS beschränken (Abb. 62). Eine ausführliche Besprechung der weiteren Aminosäuresequenzen wird in der Arbeit von VOIT (1987) gegeben.

Cheliceraten-Hc	29 (57)	46 (74)
Eury-DNA e	Q I D A R	F S C F H
Eury e	Q I R A R	F S D F H
Eury d	E R D P R	F G S F H
Eury a	Q I D E R	F S C F Y
Lim II	K H S D R	F S C F H
Tach α	E R D N R	F S L F H
Crustaceen-Hc		
Pint a	T L M K E	Y S L F N
Alep b		F S L F N

Abb. 62: Unterschiede von genomischer DNA-Sequenz und proteinchemischer Sequenz im N-terminalen Abschnitt der Hc UEe (Pos. 1-73, s.a. Abb. 60) von E. californicum, sowie Vergleich zu anderen Arthropodenhämocyaninen.
Eury a,d — Eurypelma californicum UEa/d
Lim II — Limulus poyphemus UEII
Tachy α — Tachypleus tridentatus UEα
Pint a — Panulirus interruptus UEa
Alep b — Astacus leptodactylus UEb
Die Numerierung in Klammern ist eine Anlehnung an LINZEN et al. (1985).

Die Identifizierung eines Asparaginsäurerestes in Position 29 anstelle eines Argininrestes erhöht den Grad an Homologie zu den Hc UEa und d von E. californicum, sowie zur Hc UEα von Tachypleus tridentatus. Der zweite Unterschied in Position 46 betrifft einen Asparaginsäurerest. Hier wurde nach Sequenzierung genomischer DNA ein Cysteinrest identifiziert. Eine mögliche Erklärung für diesen Unterschied ist, daß Cystein- und Asparaginsäurereste relativ leicht sowohl als DABTH-Derivate nach zweidimensionaler Auftrennung auf DC-Fertigfolien als auch als PTH-Derivate nach HPLC-Auftrennung verwechselt werden können; d.h. auch im N-terminalen Bereich der Hc UEe sind die Unterschiede in der Aminosäuresequenz auf methodische Fehler bei der proteinchemischen Identifizierung der AS und nicht auf Punktmutationen in einer der Triplettpositionen der jeweiligen Codons zurückzuführen (cf. VOIT, 1987).

Durch den Austausch von Cys gegen Asp in Position 46 wird auch verständlich, warum die synthetische Oligonukleotidprobe (Pos. 46-51), die auf Grund der proteinchemischen Sequenz mit den Nukleotiden für Asp gemacht wurde, nach Hybridisierung nur ein relativ schwaches Signal unter mäßig stringenten Bedingungen lieferte: nur in der dritten Triplettposition (U oder C) stimmen Asp oder Cys überein.

IV Charakteristika der für die Hc UEe der Vogelspinne E. californicum codierenden DNA-Sequenzen

IV.1 Genomorganisation

Das Gen für die Hc UEe der Vogelspinne E. californicum konnte als erstes Gen für eine Hc-Untereinheit kloniert und charakterisiert werden. Acht Hc-Klone in λ-EMBL3-Phagen decken die Transkriptionseinheit ab und schließen den möglichen mRNA-Startpunkt sowie die Polyadenylierungsstelle ein (Abb. 51). Mit 54 kBp ist das Hc-Gen ein Gen mit größerer Ausdehnung (s. SERFLING, 1982; S. 32). Ähnliche Größen werden für die Gene des LDL-Rezeptors (MG: 92000 D; SÜDHOF et al., 1985), der terminalen Deoxytransferase (MG: 56000 D; RILEY et al., 1988) und der HPRT (MG: 24500 D; KIM et al., 1986) gefunden. Wesentlich komplexer sind nur wenige bisher charakterisierte Gene, wie z.B. die für Thyroglobulin (MG: 330000 D) mit 170 kBp (MUSTI et al., 1986) und für den Faktor VIII (MG: 271000 D) mit 186 kBp (GITSCHIER et al., 1984).

Acht Introns mit einer Länge von 2,1 bis 14,2 kBp ($\bar{x}$ = 6,5 kBp) unterbrechen die Exonsequenzen (Tab. 2), so daß nur 3,5 % des primären Transkripts codierend sind (s.a. SERFLING, (1982); S. 32). In ähnlichen Größenordnungen liegt der Prozentsatz bei dem HPRT-Gen (5 %) und bei dem Gen für die terminale Deoxytransferase (3 %). Mit einer durchschnittlichen Größe $\bar{x}$ von 70,8 AS (43,0-132,3 AS) sind die mittleren Exons des Hc-Gens für die UEe wesentlich größer als die von TRAUT (1988) verglichenen Exons

Tab. 2: Größenvergleich der Exons und Introns des Gens für die Hc UEe der Vogelspinne E. californicum.

	Bp		kBp
1. Exon	190 + ~70 untr.		
		1. Intron	6,1
2. Exon	218		
		2. Intron	8,6
3. Exon	206		
		3. Intron	6,3
4. Exon	397		
		4. Intron	2,1
5. Exon	129		
		5. Intron	5,0
6. Exon	135		
		6. Intron	6,9
7. Exon	187		
		7. Intron	14.3
8. Exon	215		
		8. Intron	2,7
9. Exon	192 + 284 untr.		
$\bar{x}$ mittlere Exons (2-8):	212 70,8 AS	$\bar{x}$ Introns:	6,5

($\bar{x}$ = 44,5 AS). Auffallend ist auch, daß die 5'- und 3'-Exons mit einer Größe von ca. 64 AS der von TRAUT (1988) entdeckten Tendenz entsprechen, kleiner als die mittleren Exons zu sein. Die besonderen Eigenschaften der 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche des Gens werden gesondert diskutiert (C.IV.4 und 5).

IV.2 Exon-Intron Grenzen und einige besondere Charakteristika der Introns

Die Exon-Intron Grenzen (Tab. 3) wurden durch DNA-Sequenzvergleich von cDNA (pHC4 und pHC393, VOIT, 1987) mit genomischen DNA-Klonen sowie den Aminosäuresequenzen der Hc UEe (SCHNEIDER et al., 1983) aufgestellt.

Tab. 3: Vergleich der Exon-Intron Grenzen der Gens für die Hc UEe der Vogelspinne E. californicum.
Konsensus-Sequenzen sind unterstrichen; Pyrimidin-reiche Abschnitte der 3'-Intronenden sind grau hinterlegt.

1. Exon ... CTT TAC A GTAAGTCTCATGTCATGT...
L Y ...CGAAC[illegible]AG CT GCA AAA ... 2. Exon
T A K

2. Exon ... GAT CAA GTAAGTACATTTTATTTC...
D Q ...[illegible]ATAG GAC ATT TCT ... 3. Exon
D I S

3. Exon ... GCG AG GTAAGTCCAAATTTCGAA...
A R ...CA[illegible]TGTAA[illegible]AG G TAC GAC ... 4. Exon
Y D

4. Exon ... TTC AAT GTAAGTATGTTCATCGTT...
F N ...CTA[illegible]GTA[illegible]AG GAA AAC CCA ... 5. Exon
E N P

5. Exon ... GAA GAT GTAAGTAGTCCTTTATAA...
E D ...[illegible]CA[illegible]GCAG TTG ACA TGT ... 6. Exon
L T C

6. Exon ... GTG AAG GTATTTCTGCTTATGCAA...
V K ...[illegible]G[illegible]CA[illegible]ACAG GTA CTG TAC ... 7. Exon
V I Y

7. Exon ... GCC ACT C GTATGTTAAGCGTCCTAG...
A T ...A[illegible]A[illegible]AG TC GAC CCT ... 8. Exon
L D P

8. Exon ... GAT GCT GTAAGTGCTATGTCGTTT...
D A ...TGA[illegible]AG GTC AAC GGA ... 9. Exon
V N G

Alle Übergangssequenzen entsprechen den bisher gefundenen Konsensus-Sequenzen der Spleißregionen (BREATHNACH and CHAMBON, 1981; MOUNT, 1982), d.h. alle 5'- und 3'-Introngrenzen sind konform mit der GT...AG Regel für Nukleotide, die unmittelbar die Intronenden darstellen. Weitere charakteristische flankierende

Sequenzen sind ein zweites GT-Paar an der 5'-Introngrenze und ein Pyrimidin-reicher Abschnitt, der dem 3'-Intronende vorausgeht (Tab. 3). Introns werden je nach ihrer Positionierung den Typen 0 (zwischen den Codons), 1 oder 2 (zwischen 1. bzw. 2. Nukleotid eines Codons) zugerechnet (TRAUT, 1988). Beim Eurypelma-Gen entsprechen 5 Introns dem Typ 0, 2 dem Typ 1 und 1 dem Typ 2. Dies kommt den in der zusammenfassenden Arbeit von TRAUT (1988) gefundenen Werten sehr nahe: Typ 0 (54 %), Typ 1 (27 %) und Typ 2 (18 %). Es fällt zudem auf, daß die Exons bevorzugt (3 von 8 ohne 1. Exon) mit der Sequenz GT... beginnen, eine Beobachtung, die schon GITSCHIER et al. (1984) beim Gen für den Faktor VIII gemacht haben.

Weitere charakteristische Sequenzen aller Introns stellen die beim Prozessieren der mRNA nach Schneiden des 5'-Exon-Intron Übergangs mutmaßlichen Akzeptorsequenzen für das freie 5'-Ende des Introns in der Nähe der 3'-Spleißstelle dar (Tab. 4).

Tab. 4: Mögliche Akzeptorsequenzen für das 5'-Ende der Introns in der Nähe der 3'-Intronenden (Numerierung vom letzten Guanidinrest) nach der Konsensus-Sequenz ...CU$^{G}_{A}$(A)$^{C}_{U}$Y$_n$AG... von RUSKIN et al., (1984) und PADGETT et al., (1984).

		-94
1.	Intron	...TTACTAAG...
		-98
2.	Intron	...TTCCTAAG...
		-62
3.	Intron	...TTGTTAAC...
		-69
4.	Intron	...GTTTTAAT...
		-44
5.	Intron	...GTCTTGAC...
		-124
6.	Intron	...TTATTAAT...
		-93
7.	Intron	...ACTATAAT...
		-57
8.	Intron	...TTAATAAC...

Eine 2'-5'-Phosphodiester Brücke könnte zwischen dem markierten Adenin (A) in der Nähe der 3'-Spleißstelle und dem Guanidin am 5'-Intronende gebildet werden und somit das postulierte RNA-Lariat formen.

Zwei besondere Eigenschaften zeigen Sequenzen im 5. und 7. Intron (Abb. 57, Pos. 42-61 und Abb. 58, Pos. 1339-1361): dort erscheinen alternierende längere Abschnitte von Deoxypurin- und Deoxypyrimidinnukleotiden. Derartig synthetisierte Oligonukleotide können in vitro die besondere Struktur einer Z-DNA annehmen (HANIFORD and PULLEYBANK, 1983). Die biologische Signifikanz dieser DNA-Strukturen ist zwar umstritten, doch könnten sie eine Rolle z.B. in der Stimulierung der Transkriptionsrate spielen, wie es beim SV40 Promotor gezeigt wurde (HAMADA et al., 1984).

Das 8. Intron wurde vollständig in seiner Sequenz aufgeklärt. Mit 2726 Bp ist es das zweitkleinste Intron (Tab. 2) des Gens für die Hc UEe. Es besitzt keinen längeren offenen Leserahmen (ORF) sowohl in sense als auch in anti-sense Orientierung (s. C.V, Abb. 59).

IV.3 GC-Gehalt und Codonauswahl

Der Anteil der Basenbausteine Guanin und Cytosin am Gesamtgehalt an Basen ist für jeden Organismus charakteristisch. Er variiert bei Prokaryonten im weiten Bereich von 25-75 %, während er bei höheren Eukaryonten im engeren Rahmen von 40-50 % schwankt (JAKUBKE et al., 1983).

Von rund 16 kBp aus dem 54 kBp umfassenden Genbereich für die Hc UEe der Vogelspinne E. californicum sind 38,69 % Guanin und Cytosin (Tab. 5):

Tab. 5: Bereich des Strukturgens für die Hc UEe der Vogelspinne E. californicum.
GC-Gehalt des codierenden Bereichs, sowie der Teilsequenzen der Introns als auch der 5'- und 3'-untranslatierten Regionen; N = nicht definiertes Nukleotid.

	A		C		G		T		N	GC
	Bp	(%)	Bp	(%)	Bp	(%)	Bp	(%)	Bp	(%)
5'-untr. Region (von Hind III an)	50	(23,47)	64	(30,05)	43	(20,19)	56	(26,29)	—	50,23
Exons	542	(28,95)	454	(24,25)	430	(22,97)	446	(23,82)	—	47,22
Introns	3362	(30,49)	2010	(18,23)	2071	(18,78)	3568	(32,35)	18	37,00
3'-untr. Region bis poly(A)	108	(38,03)	51	(17,96)	39	(13,73)	86	(30,28)	—	31,69
3'-untr. Region ab poly(A)	570	(30,19)	362	(19.17)	390	(20,66)	564	(29,87)	2	39,83
Gesamtsequenz	4632	(30,30)	2941	(19,24)	2973	(19,45)	4720	(30,88)	20	38,69

Teilt man die Sequenzen in codierende Region, Intronbereich und 5'- und 3'-untranslatierte Region ein, so fällt der erhöhte AT-Gehalt (68,31 %) der 3'-untranslatierten Region bis zur poly(A)-Stelle auf. Mehrere hintereinanderfolgende $(T)_n$-Cluster in diesem Bereich sind für Eukaryonten nicht ungewöhnlich. Mit 47,22 % liegt der GC-Gehalt der Exons deutlich höher als derjenige aller Intronbereiche (37,00 %).

Im codierenden Bereich wird die Base Adenin weitaus häufiger gefunden (542 B) als Cytosin (454 B), Guanin (430 B) und Thymidin (446 B), die in annähernd gleicher Zahl auftreten. Dieser Befund kann durch die für 64 Asparagin- und Lysinreste codierenden Tripletts erklärt werden, die jeweils in erster und zweiter Position als Base ein Adenin enthalten. Während die Codons für Asparagin- und Lysinreste nur 6,6 % Anteil an den 61 verschiedenen Codons für die tRNAs haben, sind sie mit 10 % in der mRNA überrepräsentiert. Zudem wird das Codon GAA für den Glutaminsäurerest fast dreimal so häufig benutzt als das zweite Codon GAG (Tab. 6).

zweite Base

erste Base	U			C			A			G			dritte Base
U	5 (20,00)	UUU	Phe	4 (13,33)	UCU	Ser	8 (28,57)	UAU	Tyr	3 (27,27)	UGU	Cys	U
	25 (80,00)	UUC		5 (16,67)	UCC		20 (71,43)	UAC		8 (72,73)	UGC		C
	1 (1,89)	UUA	Leu	7 (23,33)	UCA		0 (0,00)	UAA	Stop	0 (0,00)	UGA	Stop	A
	14 (26,42)	UUG		2 (6,67)	UCG		1 (100)	UAG		6 (100)	UGG	Trp	G
C	8 (15,09)	CUU	Leu	11 (35,48)	CCU	Pro	10 (35,71)	CAU	His	10 (30,30)	CGU	Arg	U
	14 (26,42)	CUC		5 (16,13)	CCC		18 (64,29)	CAC		2 (6,06)	CGC		C
	4 (7,55)	CUA		12 (38,71)	CCA		8 (44,44)	CAA	Gln	3 (9,09)	CGA		A
	12 (22,64)	CUG		3 (9,68)	CCG		10 (55,56)	CAG		2 (6,06)	CGG		G
A	11 (33,33)	AUU	Ile	13 (40,63)	ACU	Thr	12 (42,86)	AAU	Asn	3 (10,00)	AGU	Ser	U
	20 (60,61)	AUC		8 (25,00)	ACC		16 (57,14)	AAC		9 (30,00)	AGC		C
	2 (6,06)	AUA		10 (31,25)	ACA		11 (32,35)	AAA	Lys	9 (27,27)	AGA	Arg	A
	17 (100)	AUG	Met	1 (3,13)	ACG		23 (67,65)	AAG		7 (21,21)	AGG		G
G	11 (23,40)	GUU	Val	14 (45,16)	GCU	Ala	24 (48,98)	GAU	Asp	10 (26,32)	GGU	Gly	U
	16 (34,04)	GUC		11 (35,48)	GCC		25 (51,02)	GAC		8 (21,05)	GGC		C
	13 (27,66)	GUA		5 (16,13)	GCA		34 (74,00)	GAA	Glu	19 (50,00)	GGA		A
	7 (14,89)	GUG		1 (3,23)	GCG		12 (26,00)	GAG		1 (2,63)	GGG		G

Tab. 6: Codon-Häufigkeit in der Hc mRNA (aus genomischer DNA abgeleitet) der UEe. Absolute sowie relative (in Klammer Prozentangabe) Häufigkeit synonymer Codons; seltene Codons (< 10,00 %) grau hinterlegt.

Durch die im Vergleich zu VOIT (1987) neu hinzugekommenen 73 AS des N-terminalen Bereichs werden die bei VOIT angegebenen relativen Codonhäufigkeiten nicht wesentlich verändert (Tab. 6). Damit werden die von GRANTHAM (1980) und GRANTHAM et al. (1980, 1981) gemachten Beobachtungen bestätigt, daß synonyme Codons, vor allem in stark exprimierten Genen, nicht nach Zufall ausgewählt werden. Da nach IKEMURA (1981, 1982) in stark exprimierten Genen eine Korrelation zwischen Codonhäufigkeit und verfügbarem tRNA-Isoakzeptor besteht, wurde die Häufigkeitsverteilung seltener Codons (< 10 %; grau hinterlegte Codons in Tab. 6) untersucht. Eine Anhäufung seltener Codons wird beim Eurypelma Hc-Gen für die UEe aber nicht beobachtet (Abb. 63).

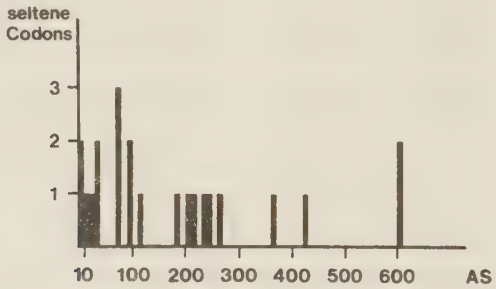


Abb. 63: Häufigkeitsverteilung seltener Codons (< 10,00 % rel. Häufigkeit) der mRNA für die Hc UEe der Vogelspinne E. californicum.
Seltene Codons:
UUA (1,89 %) und CUA (7,55 %) für Leu, AUA (6,06 %) für Ile, UCG (6,67 %) für Ser, CCG (9,68 %) für Pro, ACG (3,13 %) für Thr, GCG (3,23 %) für Ala, CGC (6,06 %), CGA (9,09 %) und CGG (6,06 %) für Arg und GGG (2,63 %) für Gly.

Für das Hc-Gen der Vogelspinne E. californicum gilt daher nicht die Beobachtung von PURVIS et al. (1987) am Gen der Pyruvatkinase aus der Bäckerhefe: dort liegt eine Anhäufung seltener Codons genau an der Stelle vor, an der die zweite von der dritten Domäne getrennt wird. Eine Verzögerung im Translationsprozeß soll nach PURVIS et al. (1987) eine derartige Faltung der schon bestehenden Polypeptidkette bewirken, wie sie ohne "Translationspause" nicht entstehen könnte.

IV.4 Das 5'-Ende des Gens für die Hc UEe der Vogelspinne E. californicum

Die nicht codierende 5'-Region des Gens für die Hc UEe konnte durch Hybridisierung mit einem (spezifisch für das erste Exon) synthetisierte Oligonukleotid (s. C.IV) auf UK Hc 1E/S1,6 festgelegt werden. Die anschließende vollständige Sequenzierung des Inserts lieferte ein überaschendes Ergebnis: rund 630 Bp von der Sal I-Schnittstelle aus gesehen sind mit UK-DNA-Sequenzen aus einem cDNA-Klon (pHC721) der Hc UEb (SONNER, pers. Mitteilung) identisch (Abb. 64).

```
Sal I
GTCGACATGATTTAATACCGAAAATGTGGCAATAAATTCTCACACAGGTAATTGCACTTC 60
CCCTATTGCATCTGCTTACAGATAGGTATTTTCAAAAAATGGCTTAGTTTTAATTTTTGT 120
GCTGTTTGATTAATGAAAAGTGATTTTGTTACCTCAACACGCTAAAAAATCAGAAAAGCA 180
AATAGAAAAAAATTACTGCTGCCAAAATGGAATTGAAAATTTAAAAATGTATTAATTGGT 240
TGCATATAACATTTTTCTGATGAACTGGAAACTCAAAAGTACCAAACTTTGAAGAACAGC 300
TAGTTGCGAGGAAATCGACTCAACAAAAAACAAATTCTTGTTTTGTTTTTGTTTTGTTTT 360
TTTTTTTTACTTGCTGTGTTATTCTTTCCCTTTTCTATCGTCTTACTATGGCCTAAAATT 420
AGTAACTCTTAGTAACTTCAAATTTCCATTTCCGTCAAAAACATATAAAGTTCGTGCATC 480
                                                Bam HI
ATCATACATTCCTGCGATACCTTGAAAATCTTTCAACACTAGGATCCAGTGAAAAGGGCA 540
GAACATATCCTAGATGAGGGCACAAACACAAATCGCAAAAAAATTTGGTTTACTCGAATC 600
TCCAGAAGCGTATTGGTTCACTGCAAGTAAATTCCCAAATTTTGGATATTTCGAGAGACA 660
             Bgl II        ←pHC721/3
TCGCGTGTAATGAGATCTGGAGGGGTTTATCAAACAGCGATTTTCCTTTGCCATGTACAA 720
ACTTGAGTACTATTACATGAAGTTTTATAGAACTTATCGTGCAGATACATGGACAGACAA 780
ACAAGACAAAATCTGCGATTTGTTTGTTTTTTATGAAATAATTGTGTTTTGTATTTTGTT 840
TTTCTTAATTTTCCCCTTAGTTCGGATTCACTGAATTGTCTGCATCGTCTCAAATATTTT 900
CACGAAAGTAAATCATAAGACTGAATTTACCGATAAATCCCCTTCTTCATGGTTGTCTAA 960
TATTAGCATCCAT
Hind III
                -200
AAGCTTCGCGACATTTCCTCTCAAGTCGAACTTAGTGCCAACAGCAAACATTTCCGTGAA 1033
                                                          Sau
          -140                -130                    -100
ACAGCCTAATTGTCTCGCCCTTGGGTGACCACCGGAAACTGGCGGTCTATAAAAGTCCTG 1093
3AI                -80      -70          -60     Sau 3AI
ATCATCTCTTCCAGAGCACGCTTGACAGTTGAGCCTCGGGATCGTTCCTTTGTTATCCTT 1153
   -30      Sau 3AI        -10          -1    +1
CTCATCCCAGATCCAGCTGAGTAGCCAGCCATC    ATG CCG GAC AAA CAG AAG  1204
                                      M   P   D   K   Q   K
                                          1       Sau 3AI
CAA CTC CGG GTT ATC AGC TTG TTC GAG CAT ATG ACC TCG ATC AAC  1249
 Q   L   R   V   I   S   L   F   E   H   M   T   S   I   N
                 10                                      20
```

Abb. 64: Ausschnitt aus dem UK Hc 1E/S1,6: 5'-Ende des Gens für die Hc UEe der Vogelspinne E. californicum.
←pHC721/3 entspricht Übereinstimmung mit den Sequenzen

des Uk pHC721/3 aus der Hc UEb bis zur Sal I-Schnittstelle; TATA-Box und CAAT-Box (in gegenläufiger Richtung) sind schattiert; mögliche Bindungsstellen für Transkriptionsfaktor Sp1 unterstrichen;
$\delta\longrightarrow$ möglicher mRNA-Startpunkt, weitere Möglichkeiten (bei Pos. -67 und - 81) grau hinterlegt; Sequenzbereich (140 Bp), der in der EMBL-Datenbank überprüft wurde, grau hinterlegt.

Dies kann nur durch Rekombinationsereignisse der Plasmid-DNA beim Unterklonieren bzw. der Phagen-DNA beim Etablieren der Genbank erklärt werden. Eine Überprüfung eines charakteristischen Teils dieser Sequenzen (s. Abb. 64) in der EMBL-Datenbank (freundlicherweise durchgeführt von Herrn Dr. Duchêne am Genzentrum München) erbrachte keinen E. coli Abstammungsnachweis. Es ist zu bedenken, daß erst ein Bruchteil E. coli chromosomaler DNA-Sequenzen bestimmt wurden. Möglicherweise spielen bei der Erstinfektion der verwendeten Wirtsbakterien (Q359) mit rekombinanten Phagen (Genbank-Etablierung) sogenannte "chi"-Sequenzen eine Rolle, die vom RecBC-Enzym des Wirts erkannt werden und Rekombinationen einleiten können (KOBAYASHI et al., 1984). Eine mögliche Überwindung dieser Klonierungsartefakte schafft eine Genbank-Etablierung in recBC$^-$-Wirtsstämmen (CES 200 oder CES 201, WYMAN and WERTMANN, 1987).

Die Diskussion des 5'-Endes des Gens für die Hc UEe der Vogelspinne E. californicum soll auf Grund der Ungewissheit über die gerade diskutierte Authentizität der DNA-Sequenzen auf rund 200 Bp "upstream" des AUG-Startcodons beschränkt werden.

Auffallendster Bestandteil eines Promotors eukaryontischer Strukturgene ist die sogenannte "Hogness"-Box mit der Sequenz TATA$^{T}_{A}$A . Sie wurde vor fast allen eukaryontischen Genen (Ausnahme z.B. Progesteron Rezeptor-Gen: HUCKABY et al., 1987 oder Erythropoietin-Gen: LIN et al., 1985) gefunden und ähnelt in Struktur und Funktion, d.h. der exakten Positionierung des Transkriptionsstarts, der prokaryontischen "Pribnow"-Box. WASYLIK et al. (1980 a und b) sowie MYERS et al. (1985) haben die Bedeutung der "Hogness"-Box für die Transkriptionsinitiation beim Conalbumin-

und Adenovirus-Gen sowie beim β-Globin-Gen durch in vitro Transkriptionsanalysen nach Deletions- und Mutationsstudien ausgewählter Promotorelemente klargestellt.

Ein weiteres für die Transkriptionsinitiation wichtiges Promotor-nahes Element ist bei vielen Strukturgenen die sogenannte CAAT-Box. Diese Sequenz findet sich nur in gegenläufiger Richtung (GTTA) bei Position -142 (Abb. 64), eine Beobachtung, die schon McKNIGHT and KINGSBURY (1982) beim Herpes Virus TK-Gen machten. Die CAAT-Box ist, unabhängig von ihrer Orientierung, in der Lage Transkriptionsinitiationsfaktoren zu binden (LA THANGUE and RIGBY, 1988).

CTCGCCC (Pos. -134 bis -140) und GGCGG (Pos. -109 bis -113) sind Sequenzen mit starker Homologie zur Bindungsstelle für den Transkriptionsinitiationsfaktor SP1 (JONES et al., 1985). Entscheidend für den genauen Transkriptionsstart kann weiterhin die Struktur des "Cap" Ortes (CCATTC ; HENTSCHEL et al., 1980) sein, die Stelle, an der die Transkription unmittelbar beginnt. Bei den meisten Strukturgenen findet man hier das Dinukleotid CA (CORDEN et al., 1980), das rund 30 Bp "fluβabwärts" der TATA-Box liegt. Eine wahrscheinliche Stelle für den Transkriptionsstart beim Hc-Gen für die UEe ist bei Position -76, genau 30 Bp von der TATA-Box entfernt; Startpunkte sind aber auch bei Position -81 und -67 denkbar. Die genaue Lokalisierung des Transkriptionsstarts wird erst durch Anwendung der Primer-Extension- oder der S1-Nuklease-Mapping-Methode ermöglicht.

KOZAK (1983) ermittelte eine optimale Sequenz für die Initiation der Translation am Ribosom: $^{A}_{G}$NNAUGG. Die Sequenz ATCATGC aus dem Hc-Gen für die UEe kommt dieser Forderung sehr nahe; das T wird von der mRNA als U gelesen, der Unterschied liegt im Austausch von C gegen G. Zwischen dem ersten AUG-Codon und dem Codon der ersten AS im "fertigen" Protein liegen bei Proteinen, die sezerniert werden, oft sogenannte Leader-Sequenzen, Codons für ein Signalpeptid. Diese wurden beim Hc-Gen nicht gefunden. Das AUG-Codon für den Translationsstart liegt unmittelbar vor dem Codon für Prolin, welches proteinchemisch als N-Terminus der Kette e

bestimmt wurde (SCHNEIDER et al., 1983). Dieser Befund stimmt mit der Beobachtung überein, daß die Hämocyanin-produzierenden Zellen, die Hämocyten der Vogelspinne (KEMPTER, 1983, 1986), mit vielen freien Ribosomen angefüllt sind. Das im Cytoplasma angehäufte Hämocyanin wird wahrscheinlich durch Platzen der Zellen in die Hämolymphe abgegeben (SMINIA, 1977).

IV.5 Die 3'-untranslatierte Region des Gens für die Hc UEe der Vogelspinne E. californicum

Der Ort der Tranlationstermination des Gens für die Hc UEe konnte auf UK Hc 6E4,7 lokalisiert werden (s. B.III.5.2) und ist in Abb. 65 dargestellt.

```
GAA GAA TTT CTA ACT CCG AGC ATG AGC TGC ACT GAT GTC AGG ATT  3970
 E   E   F   L   T   P   S   M   S   C   T   D   V   R   I
                             610
AAG TAC ACC GAT ATC AAA TAG  ACACAGAAATCACTGAAGAAAGGATAAAAAC 4022
 K   Y   T   D   I   K  Stop
         620         623
AAAAGACCTTCTAAATTATCTCAAACTTTGCAGCAGCCTTCGCATACCTTTCAAAAATTA 4082
AAACGGAAGTCTTTTTACCTTGCCGCAGCATATCAAAACAAACGAAAATGTTCATCAGTC 4142
AGAATGTAAAACTTTTTAAAATTTCTAACACTGGCCTTTTTTTGTATAACTAACACCCAA 4202
TAGTTGTACAGATTTGTCATGTTTATGTACTTGGAATATTGTTTTACGAAGTGAAATAAA 4262
              poly(A)-Schwanz
AAGTATTCGACAGAACTGTTGTCTGCCTTTTGTAGAAGCATAATTATTCATCGGCAACA 4322
TTTTAGCGTTTTCAAATATCACGAAAGAGCGCTTTGCAATAGGACGAAGGTCTCCGTATG 4382
ACGGCCATTCGACCAATTAAAACGTACCGACAAGTAACTAAATATCGGCTTCTTATCTGA 4442
ACTGTCATATCATCACCTCACCTCATCCCCCTCCCCCTTTTTTAGAGTCACATTTCATCT 4502
          Hinc II
TTCCACAATTTCAACAATTGGCACCTCTCGTTTGGGCCCTCACAAAATTGGCTCCCTGAGAG 4562
GAAATCCAGATGTTGGAGAGGTGAGAGTGTTAAAAAAAGGGTGGAGAAGGAAAAACGCGT 4622
GTTGGTGGGTGGGAGAGGTGCAGCTCGGCAGTGTAAAATTATGAGAAACGGTCCGATAAG 4682
CCTCCTCAAAAAAGTAAACCCGATACTGGCGAAGTCCCTGAAATAGAGTTGTTGTACACA 4742
```

Abb. 65: Ausschnitt aus dem UK Hc 6E4,7, codierend für das letzte Exon der Hc UEe der Vogelspinne E. californicum. Wichtige Sequenzen (s. Text) der anschließenden 3'-untranslatierten Region sind schattiert oder umrandet; ★ markiert das Ende der cDNA (s. VOIT, 1987); umrandete Nukleotide (GAAA!) stellen mögliche poly(A)-Schwanz Anfügungsstellen dar.

Die auffallendste Struktur dieser Region stellt die Sequenz AATAAA eukaryontischer Strukturgene (mit einigen Ausnahmen, z.B. Histon-Gene, HENTSCHEL et al., 1980) dar. Sie wird als Erkennungssequenz der poly(A)-Polymerase angesehen, kommt nach PROUDFOOT and BROWNLEE (1976) ca. 10-30 Bp vor der poly(A)-Anfügungsstelle zu liegen und ist für korrektes 3'-Splicing der Primärtranskripte, die weit über die poly(A)-Stelle hinausgehen können (NEVINS, 1983), und somit als Terminationssequenz der Transkription mitverantwortlich (PROUDFOOT and WHITELAW, 1988). Das Poly-Adenylierungssignal wurde von VOIT (1987) durch cDNA-Sequenzierung der UEe bestimmt. Zusätzlich zur AATAAA-Sequenz sind für das korrekte 3'-Splicing einige konservierte Strukturen von Bedeutung (GIL and PROUDFOOT, 1984), die meist "stromabwärts" der poly(A)-Stelle gefunden wurden. Auch das Hc-Gen der UEe zeigt solche Abschnitte: direkt nach der poly(A)-Stelle fallen G/T-Cluster - allgemeine Struktur YGTGTTYY (McLAUCHLAN et al., 1985) - und oligo(T)-Abschnitte auf, die nach BIRNSTIEL et al. (1985) bis zu einer Region 30 Bp "stromabwärts" der poly(A)-Stelle vorkommen.

Ein weiteres, für das 3'-Splicing der prä-mRNA bedeutsames Element, das Pentanukleotid CA$^{C}_{T}$TG (BIRNSTIEL et al., 1985) ist dreimal in der Region 230-270 Bp "stromabwärts" der poly(A)-Stelle vorhanden. Eine weitergehende Besprechung der 3'-untranslatierten Region (Nukleotidzusammensetzung) sowie der AATAAA-Sequenz über deren Bedeutung und Funktion, ermittelt durch Deletions- und Punktmutationsstudien (Review: BIRNSTIEL et al., 1985), erfolgte bereits in der Arbeit von VOIT (1987).

IV.6 Vergleich der Exons mit der postulierten Domänenstruktur der Hc UEe der Vogelspinne E. californicum

Ein Charakteristikum Protein-codierender Gene höherer Eukaryonten ist besonders auffallend: die Mosaikstruktur aus Exons und Introns. Schon bald nach der Entdeckung, daß der codierende Anteil dieser Gene durch "intervening sequences" unterbrochen wird (z.B. beim Ovalbumin-Gen: BREATHNACH et al., 1977; oder beim β-Globin-Gen: JEFFREYS and FLAVELL, 1977) wurde über deren funktionelle und evolutionäre Bedeutung spekuliert. GILBERT (1978) und BLAKE (1978) postulierten, daß Exons funktionelle oder strukturelle Einheiten der Proteine seien. Demnach können durch die Kombination von Exons aus verschiedenen Genen durch den Prozeß des Trennens und Wiederverknüpfens dieser Einheiten - mit den Introns als Puffer dazwischen - neue funktionstüchtige Einheiten (Gene) entstehen. Dieses sogenannte "exon-shuffling" Modell erklärt, warum Introns für die Evolution der Proteine so bedeutend sind: sie erlauben eine relativ ungenaue Rekombination zwischen Elterngenen, ohne daß die Funktion des neugeschaffenen Gens (z.B. durch Verlust von codierenden Nukleotiden oder Verschieben des Leserahmens) beeinträchtigt wird.

Um die Anwendbarkeit des "exon-shuffling" Modells auf das Hc-Gen für die UEe zu überprüfen, wurde zunächst in der EMBL- und MIPSY-Datenbank (UWGCG; FASTN und FASTP-Programm; VAX-Computer am Genzentrum der Universität München, mit freundlicher Hilfe von Herrn Dr. Duchêne) für jedes der neun Exons sowohl nach homologen DNA- als auch Proteinsequenzen gesucht. Homologien bzw. Identitäten beschränkten sich aber nur auf sehr kurze Abschnitte (maximal 60 % Identität bei ca. 90 verglichenen NT oder ca. 40 % Identität bei 27 verglichenen AS) von Proteinen, die nicht den Hämocyaninen zuzurechnen sind. Insbesondere wurden die von LERCH et al. (1986) beschriebenen Homologien des "Kupfer B"-Zentrums der Hämocyanine von E. californicum sowie der Schnecke Helix pomatia und der Tyrosinasen von Neurospora crassa und Streptomyces glaucescens nicht gefunden. Der Aspekt der gemeinsamen Evolution der Hämocyanine und Tyrosinasen wird weiter unten noch einmal aufgegriffen.

Eine weitere Möglichkeit in der Entwicklung eines Proteins besteht darin, Exons oder das gesamte dazugehörige Gen zu verdoppeln. Mit Hilfe des GAP-Programms (Standard-Bedingungen; s.o.) wurden die DNA-Sequenzen der neun Exons miteinander verglichen (Abb. 66).

Exon Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
2	41,9 (225)							
3	40,0 (214)	33,5 (218)						
4	40,4 (397)	35,8 (397)	39,8 (397)					
5	38,4 (197)	38,0 (218)	41,1 (206)	45,0 (397)				
6	39,9 (195)	34,8 (218)	35,6 (206)	43,7 (397)	36.0 (136)			
7	35,9 (196)	34,2 (218)	40,4 (210)	35,3 (397)	40,7 (188)	38,5 (187)		
8	37,4 (218)	40,4 (230)	42,3 (227)	38,1 (397)	40,3 (215)	42,2 (215)	40,9 (221)	
9	35,6 (197)	37,0 (218)	35,4 (206)	42,2 (397)	42,9 (195)	39,3 (192)	31,5 (192)	32,8 (215)

Abb. 66: Vergleich der DNA-Sequenzen der einzelnen Exons miteinander;
angegeben ist die Identität der verglichenen (Zahl in Klammern) Nukleotide in Prozent.

Auf Grund der geringen Homologie der einzelnen Exons zueinander konnte keines der Exons einem anderen zugeordnet werden. Die von der holländischen Arbeitsgruppe um W. Hol favorisierte Theorie einer Genverdoppelung der "Kupfer B"-Bindungsstelle (Exon 4 und 5), aus der die "Kupfer A"-Bindungsstelle (Exon 3) entstanden sein könnte, erscheint daher fraglich und wird weiter unten ausführlich dikutiert.

Die Forderung, Exons sollten für funktionelle oder strukturelle Einheiten codieren, impliziert zugleich, daß Introns möglichst nicht innerhalb von Sekundärstrukturen zu liegen kommen, die für die Architektur der Domäne wichtig sind. Eine Sekundärstrukturvoraussage der Hc UEe wurde mit den Daten der proteinchemisch bestimmten Aminosäuresequenz (SCHNEIDER et al., 1983) nach den Methoden von CHOU-FASMAN (1978) und GARNIER et al. (1978) angefertigt (Abb. 67).

Unter dem Vorbehalt, daß diese Voraussagen nur mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 60 % zutreffen, kann man folgendes erkennen: Introns "schneiden" die Polypeptidkette der Hc UEe meistens in Turns zwischen α-Helices oder β-Faltblattstrukturen (Ausnahmen: 1. und 8. Exon). Auffallend ist auch, daß die Exon-Intron Grenzen eher an der Oberfläche des Proteins anzutreffen sind, eine Feststellung, die mit Aussagen von CRAIK et al. (1986) übereinstimmt.

Die erste Tertiärstruktur eines Hämocyanins erstellten GAYKEMA et al. (1984) durch röntgenkristallographische Untersuchungen der deoxygenierten UEa des Hämocyanins der Languste Panulirus interruptus. Durch den hohen Grad der Homologien der durch proteinchemische Methoden bisher ermittelten Hämocyaninsequenzen schlossen LINZEN et al, (1985), daß alle Arthropoden-Hämocyanine die gleiche Tertiärstruktur besitzen, wobei geringfügige Modifikationen durchaus in Betracht gezogen werden müssen.

Nach den röntgenkristallographischen Untersuchungen von GAYKEMA et al. (1984) besteht die Polypeptidkette des Arthropoden-Hämocyanins aus 3 Domänen (Abb. 68); das aktive Zentrum mit CuA- und CuB-Bindungsstelle ist in der 2. Domäne lokalisiert. Trägt man die nach Genomanalyse der UEe erhaltenen Introngrenzen in die Tertiärstruktur des Arthropoden-Hämocyanins ein (Abb. 68), lassen sich folgende Aussagen machen:

1) 2 Exons codieren für die 1. Domäne, 3 für die mittlere und 4 für die letzte Domäne.

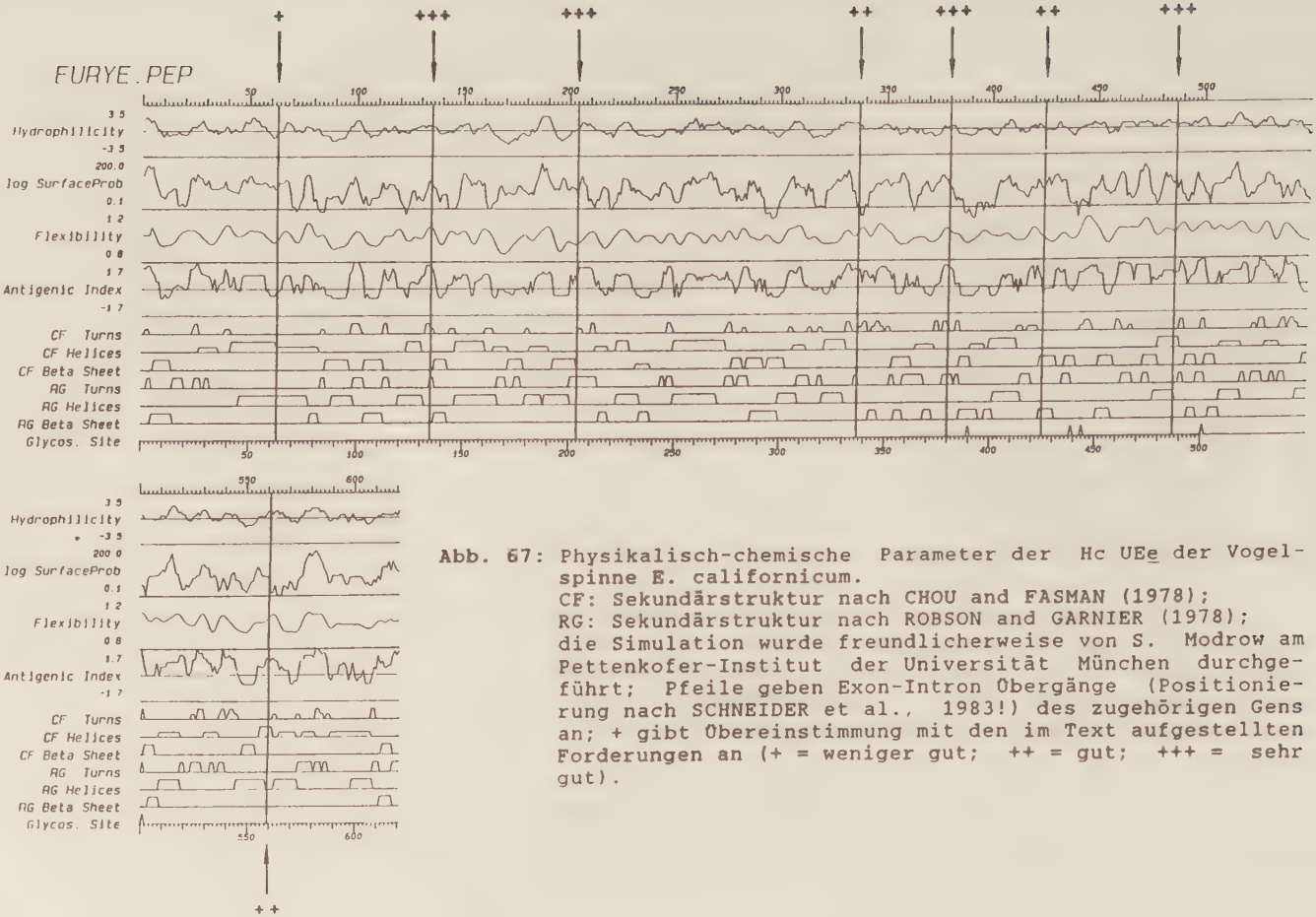


Abb. 67: Physikalisch-chemische Parameter der Hc UEe der Vogelspinne E. californicum.
CF: Sekundärstruktur nach CHOU and FASMAN (1978);
RG: Sekundärstruktur nach ROBSON and GARNIER (1978);
die Simulation wurde freundlicherweise von S. Modrow am Pettenkofer-Institut der Universität München durchgeführt; Pfeile geben Exon-Intron Übergänge (Positionierung nach SCHNEIDER et al., 1983!) des zugehörigen Gens an; + gibt Übereinstimmung mit den im Text aufgestellten Forderungen an (+ = weniger gut; ++ = gut; +++ = sehr gut).

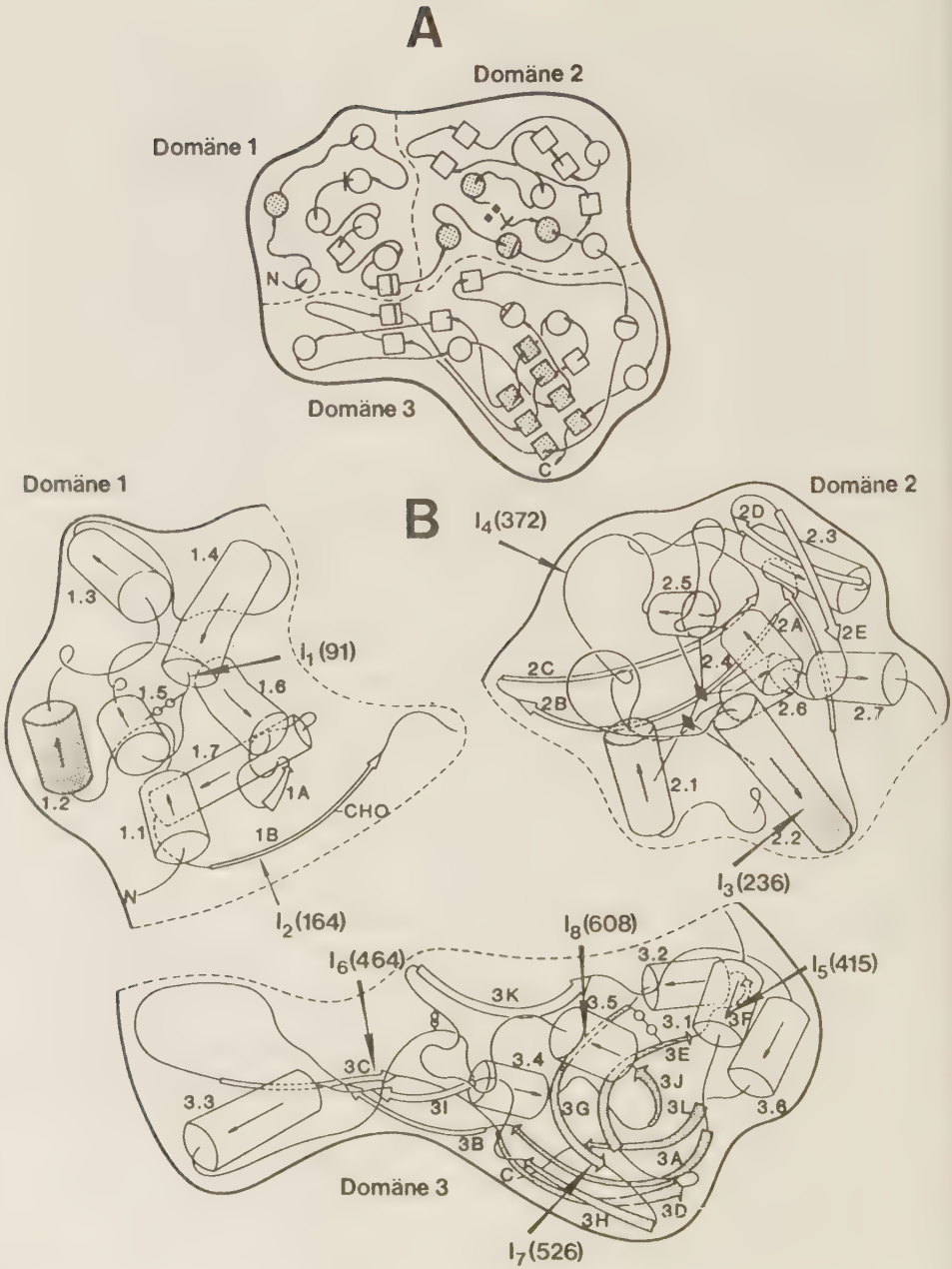


Abb. 68: A: Schematische Darstellung einer Hc Untereinheit (aus LINZEN et al., 1985).

○ = α-Helices; □ = β-Faltblatt.
Die drei Domänen sind durch die gestrichelte Linie getrennt; die Introngrenzen sind schematisch durch Querbalken eingezeichnet. Die 4 Helices des aktiven Zentrums in Domäne 2 sind punktiert; die 7 β-Faltblattstrukturen, die in Domäne 3 ein "β-barrel" bilden, sind ebenfalls punktiert. Die punktierte Helix in Domäne 1 wird nur bei P. interruptus gefunden, andere Arthropoden-Hämocyanine haben an dieser Stelle eine Deletion.

B: Einzeldarstellung der einzelen Domänen des Arthropoden-Hämocyanins.
Die Intronpositionen (I_1-I_8, Zahlen in Klammern nach der UEa von P. interruptus) sind durch Pfeile gekennzeichnet.

2) Exon-Intron-Übergänge markieren ziemlich genau die Unterteilung der Hc UE in Domänen; d.h. Exons codieren nicht für Domänen, sondern wahrscheinlich für Subdomänen, die Modulen entsprechen (s. TRAUT, 1988, als Review).
3) Introns können in Sekundärstrukturen, wie α-Helices oder β-Faltblattstrukturen, hineinschneiden. Nur der 1. und 4. Exon-Intron-Übergang unterbrechen die codierende Sequenz nach α-Helix 1.4 bzw. α-Helix 2.5. Alle anderen Exon-Intron-Übergänge würden in Sekundärstrukturen zu liegen kommen:
   der 2. in β-Faltblatt 1B
   der 3. in α-Helix 2.2
   der 5. in α-Helix 3.1
   der 6. in β-Faltblatt 3C
   der 7. in β-Faltblatt 3G
   der 8. in α-Helix 3.5.

Um die Lage der einzelnen Exon-Intron-Übergänge in bezug auf die räumliche Ausdehnung der UEa von P. interruptus zu verdeutlichen, wurden in stereoskopische Bilder der einzelnen Domänen sowie der gesamten Untereinheit die Schnittstellen der Introns mit Pfeilen markiert (Abb. 69).

A
I7
I6
I5
I8
I2
I3
I1
I4
B
I1
I2
C
I3
I4

D

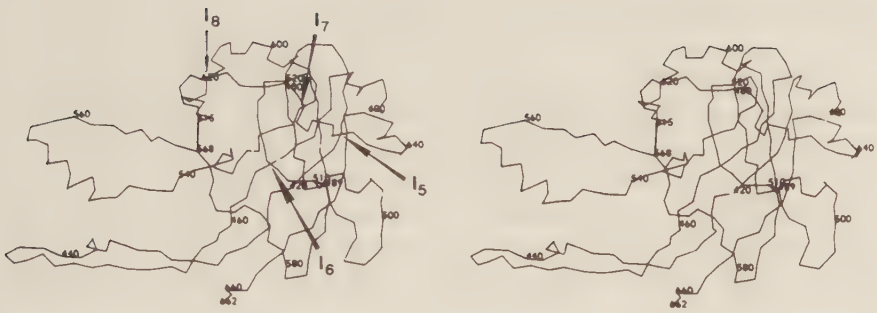


Abb. 69: Stereoskopische Bilder des Rückgrats der Hc UEa von P. interruptus.
A: gesamte Untereinheit; B: 1. Domäne; C: 2. Domäne;
D: 3. Domäne.
I_1-I_8: Introns, entsprechend der Lage im E. californicum Gen der UEe; Homologisierung der beiden Untereinheiten nach LINZEN et al. (1985); die Abbildung wurde dem Artikel von GAYKEMA et al. (1984) entnommen.

Sehr gut kann man die oberflächennahe Lage aller Exon-Intron-Übergänge erkennen. Dies steht in guter Übereinstimmung mit der Oberflächenwahrscheinlichkeitsvoraussage log Surface Prob. in Abbildung 67. Unterstützung würde auch die Hypothese erfahren, daß - unter der Voraussetzung, Proteine werden aus austauschbaren Modulen (Subdomänen = Exons, s.a. "exon shuffling" Modell von GILBERT, 1978) aufgebaut, die Verknüpfungspunkte der Module an der Oberfläche liegen müssen; andernfalls würde beim Zusammenbau zu einem neuen Protein die Tertiärstruktur und somit die Funktion der einzelnen Module gestört werden (CRAIK et al., 1982).

V Anmerkungen zur Evolution der Hämocyanine

Schon seit längerem ist die 3D-Struktur einer Arthropoden-Hc UE bekannt (GAYKEMA et al., 1984). Das zugehörige Gen einer Hc UE konnte aber erst in dieser Arbeit zum erstenmal aufgeklärt werden. Um nun aus der Sicht dieser neueren Ergebnisse die Evolution der Hämocyanine zu besprechen, soll zuerst der Zusammenhang zwischen Domänenstruktur einerseits mit dem Mosaik aus Exons und Introns andererseits verdeutlicht werden (Abb. 70, s.a. TRAUT, 1988).

Auf Grund der Ähnlichkeit des "Kupfer B"-Bindungszentrums, das von 2 Exons codiert wird, mit dem "Kupfer B"-Bindungszentren der Mollusken und Tyrosinasen (s.a. weiter unten) kann angenommen werden, "Kupfer B" sei die entwicklungsgeschichtlich gesehen ältere Kupferbindungsstelle. Nun könnte man folgern, daß "Kupfer A" durch Genduplikation und Genfusion eines früheren "Kupfer B"-haltigen Peptids entstanden ist (VOLBEDA, 1988). Unterstützt wird dieses Argument durch den Befund, daß die Kupferbindungszentren starke Homologien in ihrer Struktur aufweisen: jeweils drei Histidinreste ligandieren ein Kupfer-Ion. Die ersten zwei liegen mit einem Abstand von drei AS (...-H-X-X-X-H-...) in einer α-Helix und das dritte Histidin ist Bestandteil einer weiteren α-Helix, die antiparallel zur ersten Helix verläuft (GAYKEMA et al., 1984; VOLBEDA, 1988). Allerdings ist der Abstand zwischen den beiden α-Helices im "Kupfer B"-Bindungszentrum etwas größer. Die Anwendung des "exon shuffling"-Modells (GILBERT, 1978; 1985) auf die Exonstrukturen in Abbildung 70 kann eine <u>Genduplikation</u> als Ursache für die Bildung des "Kupfer A"-Bindungszentrums nicht vorbehaltlos unterstützen:

1. Durch Computerauswertung (s. Abb. 66) als auch "manuell" durch Einfügen willkürlicher Lücken ergibt sich höchstens eine Identität von 40 bzw. 41 % der DNA-Sequenzen von Exon 3 zu Exon 4 oder Exon 5.
2. Der Befund, daß "Kupfer A" von einem Exon und "Kupfer B" von zwei Exons codiert wird, erschwert die Nachweismöglichkeit für eine direkte Verwandtschaft beider Kupferbindungsstellen. Man

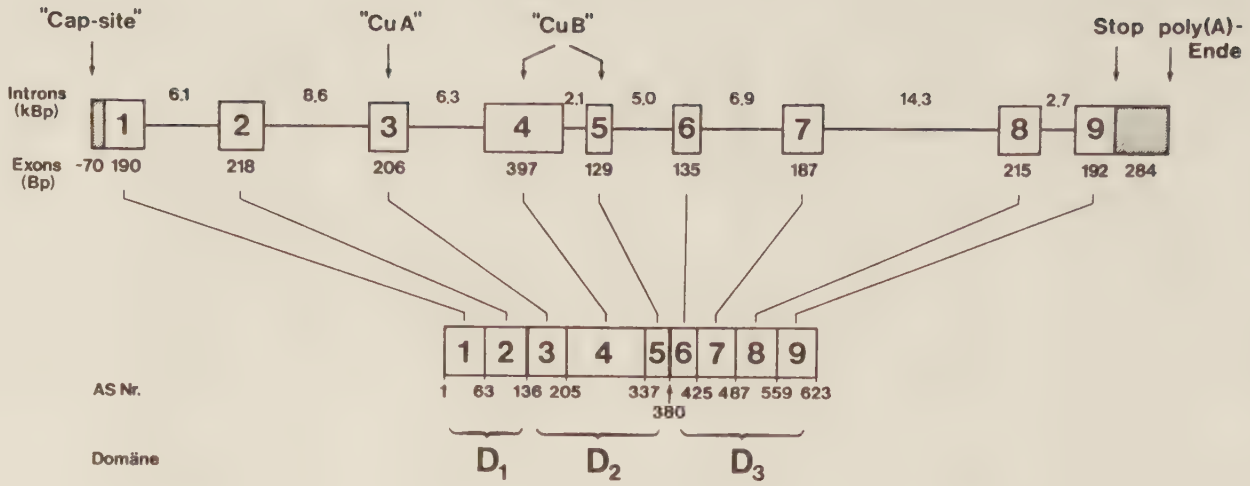


Abb. 70: Schematische Darstellung der Transkriptionseinheit für die Hc UEe der Vogelspinne E. californicum.
Einteilung der Polypeptidkette in Domänen sowie deren Bezeichnung in Relation zur P. interruptus UEa nach GAYKEMA et al. (1984); gerasterte Abschnitte von Exon 1 und Exon 9 entsprechen den untranslatierten Regionen.

müßte zugleich einen Intronverlust innerhalb des für "Kupfer A" codierenden Exons in die Diskussion einführen. Hinweise auf Intronverluste finden sich zum Beispiel bei der Globin-Genfamilie (ANTOINE and NISSING, 1984) als auch bei den Genen für die GAPDH (STONE et al., 1985; YARBROUGH et al., 1987) und für die TPI (McKNIGHT et al., 1986).

Durch die Aufklärung der Primärstrukturen einer funktionellen Einheit aus dem βc-Hc einer Schnecke (DREXEL et al., 1987) sowie verschiedener Tyrosinasen (HUBER et al., 1985; LERCH, 1978) wurde die Homologie der "Kupfer B"-Bindungszentren aller Hämocyanine sowie der Tyrosinasen erkannt (LERCH et al., 1986). So könnten Hämocyanine als auch Tyrosinasen von einem mononuklearen Vorläuferkupferprotein abstammen (Abb. 71).

Vor einer möglichen Genduplikation mit anschließender Genfusion trennten sich die Entwicklunglinien, die einerseits zum Arthropoden-Hämocyanintyp (MG einer UE: ca. 75000 D), andererseits zu den Tyrosinasen (MG ca. 30000 bis 55000 D) und zum Mollusken-Hämocyanintyp (MG einer funktionellen Einheit: 50000 D) führten. Wenn man annimmt, daß die Rate der Aminosäureaustausche annähernd gleich ist, müßte ein erstes Arthropoden-Hc vor der Entstehung eines Mollusken- und Tyrosinasen-Proteins existiert haben. Dies folgert VOLBEDA (1988) aus der Beobachtung, daß die interne Homologie der Arthropoden-Kupferbindungsstellen (z.B. 26 % für P. interruptus) niedriger ist als die Homologie zwischen dem Cu B Helixpaar von P. interruptus einerseits und den Tyrosinasen andererseits.

Da die Sequenzen der Cu B-Bindungsstelle des Mollusken-Hcs und der Tyrosinasen große Homologien (ca. 60 %) zeigen (LERCH et al., 1986), liegt die Schlußfolgerung nahe, daß sich die Mollusken-Hc von den Tyrosinasen wesentlich später trennten als von den Arthropoden-Hc. Dies sollte wiederum nur unter der Annahme einer gleichen Rate von Aminosäuresaustauschen gelten.

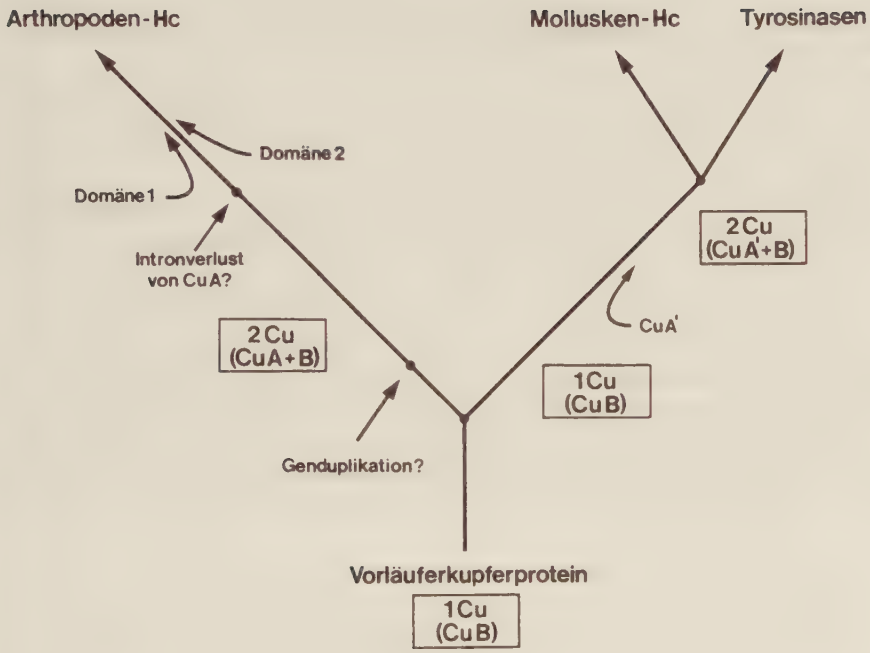


Abb. 71: Entwicklung der Hämocyanine und Tyrosinasen aus einem mononuklearen "Kupfer B"-haltigen Vorläuferprotein (Cu-B).
Cu-A bezeichnet eine Kupferbindungsstelle der Arthropoden-Hämocyanine, die der Bindungsstelle Cu-B ähnlich ist (Genduplikation als Ursache ?). Bei Mollusken-Hämocyaninen und Tyrosinasen kommt eine neue (Cu-A') Kupferbindungsstelle hinzu. (Verändert und teilweise vereinfacht nach einer Abbildung aus dem Artikel von DREXEL et al. (1987).

Neuere Arbeiten von RUPPERT et al. (1988) und MÜLLER et al. (1988) über das Maus-Tyrosinase-Gen stellen das wahrscheinlich zu einfache Evolutionsschema der Hc und Tyrosinasen, vorgestellt in Abbildung 71, in Frage. Folgende Befunde sprechen zumindest nicht für ein gemeinsames Vorläuferprotein der Hämocyanine und Tyrosinasen:

1. Die Exonstrukturen des Tyrosinase-Gens sind nicht mit denjenigen des Hc-Gens der UEe - auch nicht durch Verschieben der Spleißstellen - in Deckung zu bringen.
2. "Kupfer B" im Maus-Tyrosinase-Gen wird nur durch ein Exon (Intronverlust? s.a. weiter oben) mit wesentlich geringerer Größe als Exon 4 und 5 im Hc-Gen codiert.

Folgende molekulargenetische Arbeiten könnten die Spuren der Evolution der Kupfer-haltigen Proteine vollständig aufklären: zum einen die Strukturanalyse eines Mollusken-Hämocyanin-Gens und zum anderen die Untersuchung der Kupfer- und Sauerstoff-bindenden Eigenschaften eines künstlichen Hc-Gen-Produkts, bestehend nur aus Cu A und (oder) Cu B oder aus 2 x Cu A (2 x Cu B).

E ZUSAMMENFASSUNG

1. Aus Herz, Ovar und Lungengewebe der Vogelspinne E. californicum wurde genomische DNA nach der Phenolextraktionsmethode gewonnen. Nach partieller Spaltung der hochmolekularen DNA mit Sau 3AI wurden klonierbare Fragmente (10-22 kBp) mit Hilfe der CsCl-Gradientenzentrifugation erhalten. Nach Abspaltung der 5'-Phosphatreste mit CIP wurden die genomischen DNA-Fragmente in die Bam HI-Klonierungsstelle des Phagenvektors ∂-EMBL3 inseriert. Nach in vitro Verpackung der rekombinanten Phagen konnten 5 Genbanken (jede Genbank stammt von einem einzigen Tier) mit insgesamt 4,3 x 10^6 pfu etabliert werden.

2. Die umfangreichste Genbank (Eury IV mit ca. 1,7 x 10^6 Ausgangsphagen) wurde mit dem nach Nick-Translation radioaktiv markiertem cDNA-KLon der Hc UEe (pHC4e) durchmustert. Nach Plaquereinigung konnten 15 positive Klone selektiert werden, die in der Reihenfolge ihrer Entdeckung Hc 1 bis Hc 15 benannt wurden.

3. Nach physikalischer Kartierung der rekombinanten Klone mit den Restriktionsenzymen Bam HI, Eco RI, Hind III und Sal I, sowie anschließendem Southern-Transfer und Hybridisierung mit dem radioaktiv- oder biotin-markiertem pHC4e-Klon zeigten mehrere Klone ein identisches Restriktionsmuster, so daß schließlich 8 verschiedene Klone (Hc 1, Hc 2, Hc 4, Hc 6, Hc 10, Hc 11, Hc 12 und Hc 15) einer näheren Charakterisierung zur Verfügung standen. Alle 8 Hc-Klone konnten durch überlappende Restriktionsmuster aneinandergereiht werden. Insgesamt wurde über einen rund 65 kBp großen Bereich, in dem 7 Abschnitte mit dem pHC4e-Klon hybridisierten, eine Restriktionskarte erstellt.

4. Sequenzabschnitte der Klone Hc 10 und Hc 15 hybridisierten mit einer gemischten 17mer Oligonukleotidprobe, die der Aminosäuresequenz des konservierten "Kupfer A"-Bindungszentrums entsprach. Die nachfolgende Sequenzierung dieser Abschnitte ergab ein Exon mit 206 Bp, das für die drei an der "Kupfer A"-Bindung beteiligten Histidinreste codiert.

5. Die folgende Sequenzierung der restlichen 6 mit dem pHc4e-Klon hybridisierenden Bereiche entschlüsselte weitere 7 Exons mit dem carboxyterminalen Ende der UEe sowie anschließender 3'-untranslatierter Sequenzen, wie AATAAA-Signal und mehrerer für das 3'-Splicing der pre-mRNA wichtiger Sequenzen.

6. Das für die Hc UEe erste codierende Exon mit darüberhinausgehender 5'-untranslatierter Region konnte mit Hilfe einer für die UEe spezifischen Oligonukleotidprobe auf Klon Hc 1 lokalisiert werden. Die Sequenzierung dieses Bereichs konnte eine TATA-Box rund 100 Bp vor dem AUG-Startcodon festlegen. Dagegen konnten keine Sequenzen für ein Signalpeptid gefunden werden.

7. 0,42 % aller mit dem pHc4e-Klon verglichenen Nukleinsäuren (1653 NS) unterschieden sich in der cDNA- und genomischen DNA-Sequenz. Keine einzige der Punktmutationen in einer der möglichen Triplettpositionen löste einen Aminosäureaustausch aus. Von genomischer DNA abgeleitete AS und proteinchemisch bestimmte AS stimmten in 97,4 % aller verglichenen Positionen (623 AS) überein.

8. Insgesamt konnten 15366 NS aus dem Genbereich der Hc UEe der Vogelspinne E. californicum bestimmt werden. 8 Introns mit einer durchschnittlichen Länge von 6.5 kBp unterbrechen den codierenden Teil des Gens (ca. 54 kBp). Alle Spleißregionen entsprechen der GT...AG Regel. Die mittleren Exons sind mit einer durchschnittlichen Länge von 70,8 AS relativ groß.

9. Der Vergleich mit der nach der Röntgenstrukturanalyse an der UEa von P. interruptus aufgestellten Domäneneinteilung der Polypeptidkette erbrachte folgendes Schema: die erste Domäne wird von 2 Exons, die mittlere mit den Kupferbindungszentren von 3 und die dritte Domäne von 4 Exons codiert.

10. Die Entstehung der Hämocyanine und Tyrosinasen aus einem gemeinsamen Kupfer-haltigen ("Kupfer B") Vorläuferprotein wird diskutiert.

7 ANHANG

1 Tabellarische Darstellung der Restriktionsfragmente der Klone Nr. 1-15

Nr. 1

B	E	H	S	B/S	E/S	H/S	B/E/S	B/H/S	E/H/S
23,5	23,5	21,5	7,8	6,3	4,30	4,50	3,20	4,50	3,10
23,0	9,3	11,0	3,50	3,50	2,95	3,50	2,05	3,50	2,05
6,3	3,65	4,50	1,75	1,75	1,70	1,75	1,70	1,75	1,40
	2,95	1,25		1,05	1,60	1,25	1,40	1,25	1,40
	2,70			0,52	1,40	1,15	1,05	1,05	1,15
	1,85				0,85	1,00	1,05	0,52	1,00
	0,55				0,55		0,85	0,45	0,85
	0,30				0,35		0,55	0,15	0,65
					0,30		0,52		0,55
					0,15		0,35		0,35
							0,30		0,30
							0,15		0,30
									0,15

Nr. 2:

B	E	H	S	B/S	E/S	H/S	B/E/S	B/H/S	E/H/S
22,5	21,0	21,0	11,9	9,8	5,3	8,0	4,9	8,0	2,90
22,5	5,3	13,0	1,45	2,10	2,50	2,30	2,50	1,90	2,50
	2,50	2,30	0,95	1,45	1,42	1,45	1,42	1,45	2,30
	1,60	0,33		0,95	1,25	1,40	1,35	1,40	1,40
	1,25				1,15	0,95	1,15	0,95	1,25
	1,00				1,00	0,33	1,00	0,34	1,15
	0,45				0,80		0,80	0,33	1,00
	0,14				0,45		0,45		0,80
					0,30		0,45		0,40
					0,15		0,30		0,30
					0,14		0,15		0,15
							0,14		0,14

Hc 4:

B	E	H	S	B/S	E/S	H/S	B/E/S	B/H/S	E/H/S
22,0	22,5	20,0	9,7	7,1	3,30	4,60	3,30	4,60	2,35
11,6	10,8	6,1	4,55	4,55	3,10	2,30	2,90	1,95	2,20
9,2	3,30	2,30		2,60	2,90	1,85	2,60	1,85	1,85
	0,73	1,85			2,35	1,50	2,35	1,50	1,50
	0,14	1,50			1,65	1,45	1,65	1,45	1,45
		1,25			0,73	1,25	0,73	1,25	1,25
		0,33			0,14	0,68	0,45	0,68	0,73
						0,36	0,14	0,36	0,68
						0,33		0,34	0,36
								0,33	0,14
									0,10

Hc 6:

B	E	H	S	B/S	E/S	H/S	B/E/S	B/H/S	E/H/S
26,0	20,5	23,0	12,0	6,4	4,70	8,2	4,70	5,7	4,70
15,7	10,6	13,8	0,85	5,7	3,00	3,90	3,00	3,90	1,60
	4,70			0,85	1,25	0,85	1,20	2,50	1,40
	3,00				1,20		0,90	0,85	1,25
	1,25				0,85		0,85		1,20
	0,75				0,75		0,75		0,85
	0,50				0,55		0,55		0,75
					0,50		0,50		0,55
							0,35		0,50

Hc 10:

B	E	H	S	B/S	E/S	H/S	B/E/S	B/H/S	E/H/S
20,0	26,0	6,6	6,9	6,3	6,7	6,4	6,1	6,3	6,2
15,7	9,5	5,9	5,3	5,3	3,35	3,70	3,35	3,70	3,35
6,5	5,7	5,7	4,10	3,10	2,40	2,30	1,70	1,60	2,30
3,1	1,95	1,55	0,42	0,75	1,65	1,55	1,45	1,55	1,45
	1,40	0,70		0,65	1,40	0,70	1,40	0,75	0,70
	0,65	0,32		0,42	0,50	0,60	0,75	0,70	0,55
				0,20	0,26	0,55	0,65	0,60	0,50
					0,25	0,32	0,50	0,55	0,34
					0,16	0,20	0,26	0,42	0,32
							0,25	0,32	0,26
							0,20	0,20	0,25
							0,16	0,10	0,20
									0,16
									0,10

Hc 11:

B	E	H	S	B/S	E/S	H/S	B/E/S	B/H/S	E/H/S
21,0	20,0	30,0	7,7	5,7	4,70	7,7	4,70	5,7	4,70
21,0	9,5	8,0	3,75	3,75	2,10	2,75	2,10	2,75	2,10
	4,70		1,45	2,05	1,50	1,45	1,50	2,05	1,25
	2,70		0,70	1,45	1,25	1,00	1,15	1,45	1,15
	1,55			0,70	1,15	0,70	1,15	1,00	1,15
	1,50				1,15		0,90	0.70	0,85
	1,25				0,55		0,55		0,65
	0,45				0,40		0,40		0,55
					0,30		0,35		0,40
					0,30		0,30		0,30
					0,15		0,30		0,30
							0,15		0,15

Hc 12:

B	E	H	S	B/S	E/S	H/S	B/E/S	B/H/S	E/H/S
-	20,0	24,0	7,4	7,4	2,90	3,70	2,90	3,70	2,25
	9,7	5,3	3,70	3,70	2,35	2,65	2,35	2,65	1,45
	5,3	2,65	1,00	1,00	2,30	1,50	2,30	1,50	1,45
	2,30	1,50			0,90	1,45	0,90	1,45	1,30
	0,90	1,30			0,90	1,30	0,90	1,30	1,00
	0,90	1,10			0,75	0,65	0,75	0,65	0,90
	0,75	0,30			0,60	0,60	0,60	0,60	0,75
	0,65				0,50	0,55	0,50	0,55	0,60
	0,30				0,50	0,45	0,50	0,45	0,50
					0,30	0,30	0,30	0,30	0,50
					0,20		0,20		0,45
									0,40
									0,30
									0,16

Hc 15:

B	E	H	S	B/S	E/S	H/S	B/E/S	B/H/S	E/H/S
22,0	20,5	20,5	5,3	5,3	3,35	3,70	3,35	3,70	3,35
20,0	9,3	5,9	4,70	4,70	2,50	2,75	2,30	2,70	2,30
	5,7	5,0	3,60	2,85	2,30	2,30	1,70	1,60	1,25
	2,30	2,75		0,75	1,40	1,25	1,40	1,25	1,15
	1,40	1,30			1,15	1,25	1,15	1,25	1,00
	0,90	1,10			0,90	0,70	0,90	0,75	0,90
	0,90	0,70			0,90	0,60	0,90	0,70	0,70
	0,65	0,30			0,50	0,55	0,75	0,60	0,50
	0,30				0,30	0,30	0,50	0,55	0,50
					0,16	0,15	0,30	0,30	0,40
					0,15		0,16	0.10	0,35
							0,10		0,30
									0,16
									0,10

II Restriktionskarten der am meisten verwendeten Vektoren

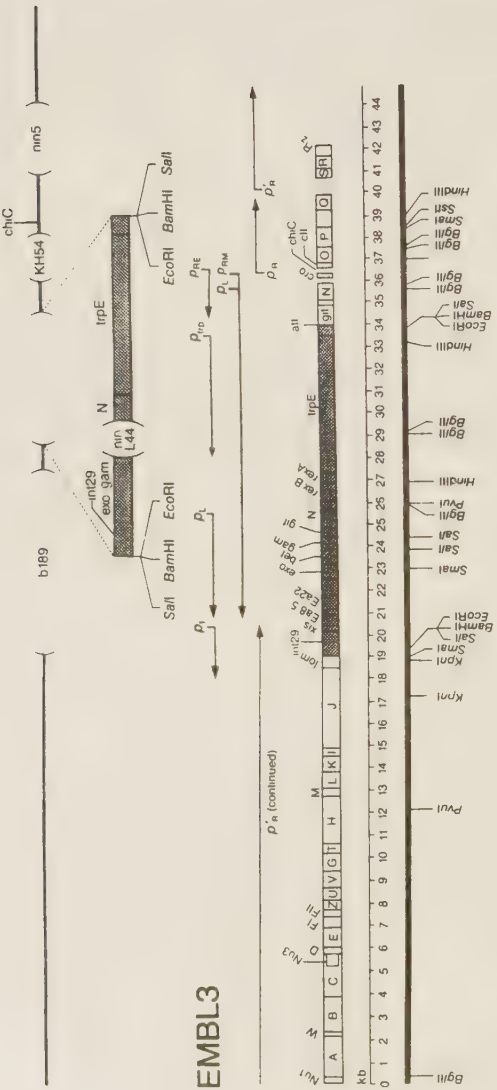


Abb. 72: Phagen-Klonierungsvektor λ-EMBL3 mit Polylinkerregion, die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme BamHI, Eco RI und SalI enthält; aus dem Artikel von FRISCHAUF et al. (1983).

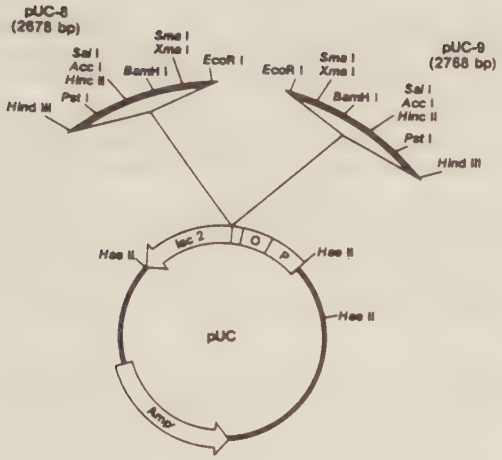


Abb. 73: Plasmid-Vektoren pUC8 und pUC9 für E. coli.

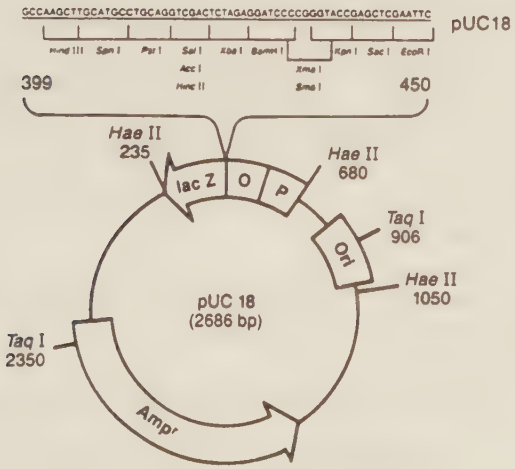


Abb. 74: Plasmid-Vektor pUC18 für E. coli.

G LITERATUR

ANDERSON, S. and KINGSTON, I.B. (1983): Isolation of a genomic clone for bovine pancreatic trypsin inhibitor by using a unique- sequence synthetic DNA probe. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 6838-6842.

ANTOINE, M. and NISSING, J. (1984): Intron-less globin genes in the insect Chironomus thummi thummi. Nature 310, 795-798.

BECKER, A. and GOLD, M. (1975): Isolation of the bacteriophage lambda A-gene protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 581-585.

BENTON, W.D. and DAVIS, R.W. (1977): Screening lambda gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. Science 196, 180-182.

BIGGIN, M.D., GIBSON, T.J. and HONG, G.F. (1983): Buffer gradient gels and ^{35}S-label as an aid to rapid DNA sequence determination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 3963-3965.

BIRNBOIM, C. and DOLY, J. (1979): Rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523.

BIRNSTIEL, M.L., BUSSLINGER, M. and STRUB, K. (1985): Transcription termination and 3'processing: the end is in site! Cell 41, 349-359.

BLAKE, C.C.F. (1978): Do genes-in-pieces imply proteins-in-pieces? Nature 273, 267.

BLATTNER, F.R., WILLIAMS, B.G., BLECHL, A.E., DENNISTON-THOMPSON, K., FABER, H.E., FURLONG, L.-A., GRUNWALD, D.J., KIEFER, D.O., MOORE, D.D., SCHUMM, J.W., SHELDON, E.L. and SMITHIES, O. (1977): Charon phages: Safer derivatives of bacteriophage lambda for DNA cloning. Science 196, 161-169.

BLIN, N. and STAFFORD, D.W. (1976): A general method for isolation high molecular weight DNA from eukaryotes. Nucl. Acids. Res. 3, 2303-2308.

BOLIVAR, F., RODRUIGUEZ, R.L., GREENE, P.J., BETTLACH, M.C., HEYNECKER, H.L., BOYER, H.W., CROSA, J.H. and FALKOW, S. (1977): Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose system. Gene 2, 95-113.

BREATHNACH, R., MANDL, J.L. and CHAMBON, P. (1977): Ovalbumin gene is split in chicken DNA. Nature 270, 314-319.

BREATHNACH, R. and CHAMBON, P. (1981): Organization and expression of eucaryotic split genes coding for proteins. Ann. Rev. Biochem. 50, 349-383.

CAMPBELL, A. (1971): Genetic structure. In: The bacteriophage lambda (HERSHEY, A.D. ed.), 13. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

CHEN, E.J. and SEEBURG, P.H. (1985): Supercoil sequencing: a fast simple method for sequencing plasmid DNA. DNA 4, 165-170.

CHOU, P.Y. and FASMAN, C.D. (1978): Prediction of secundary structure of proteins from their amino acid sequence. Adv. Enzymol. 47, 45-148.

CLARKE, L. and CARBON, J. (1976): A colony bank containing synthetic ColE1 hybrid plasmids representative of the entire E. coli genome. Cell 9, 91-99.

CORDEN, J., WASYLYK, B., BUCHWALDER, A., SASSONE CORSI, P., KEDINGER, C. and CHAMBON, P. (1980): Promotor sequences of eucaryotic protein-coding genes. Science 209, 1406-1414.

CRAIK, C.S., SPRANG, S., FLETTERICK, R. and RUTTER, W.J. (1982): Intron-exon splice junctions map at protein surfaces. Nature 299, 180-182.

DÖRPER, T. and WINNACKER, E.-L. (1983): Improvements in the phosphoramidite procedure for the synthesis of oligodeoxyribonucleotides. Nucl. Acids Res. 11, 2575-2584.

DREXEL, R., SIEGMUND, S., SCHNEIDER, H.-J., LINZEN, B., GIELENS, C., PRÉAUX, G., LONTIE, R., KELLERMANN, J. and LOTTSPEICH, F. (1987): Complete amino-acid sequence of a functional unit from a molluscan hemocyanin (Helix pomatia). Biol. Chem. Hoppe-Seiler 368, 617-635.

ELLERTON, H.D., ELLERTON, N.F. and ROBINSON, H.A. (1983): Hemocyanin - a current perspective. Progr. Biophys. Mol. Biol. 41, 143-258.

FEINBERG, A. and VOGELSTEIN, B. (1983): A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132, 6-13.

FEINBERG, A. and VOGELSTEIN, B. (1984): Addendum: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 137, 266-267.

FOELIX, R.F. (1979): Biologie der Spinnen. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

FRISCHAUF, A.-M., LEHRACH, H., POUSTKA, A. and MURRAY, N. (1983): Lambda replacement vectors carrying polylinker sequences. J. Mol. Biol. 170, 827-842.

FRISCHAUF, A.-M. (1987): Construction and characterization of a genomic library in λ. Methods Enzymol. 152, 190-199.

GARNIER, J., OSGUTHORPE, O.J. and ROBSON, B. (1985): Analysis of the accuracy and implication of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. J. Mol. Biol. 120, 97-120.

GAROFF, H. and ANSORGE, W. (1981): Improvement of DNA sequencing gels. Anal. Biochem. 115, 450-457.

GAYKEMA, W.P.J., HOL, W.G.J., VEREIJKEN, J.M., SOETER, N.M., BAK, H.J. and BEINTEMA, J.J. (1984): 3,2 Å structure of the copper-containing oxygen-carrying protein of Panulirus interruptus hemocyanin. Nature 309, 23-29.

GHIRETTI-MAGALDI, A., TAMINO, G. and SALVATO, B. (1975): The monophyletic origin of hemocyanins on the basis of the amino acid composition. Structural implications. Boll. Zool. 42, 167-179.

GHIRETTI-MAGALDI, A. and TAMINO, G. (1977): Evolutionary studies on hemocyanins. In: Structure and function of hemocyanins (BANNISTER, J., ed.), 122-127. Springer Verlag, Heidelberg, New York.

GIL, A. and PROUDFOOT, N.J. (1984): A sequence downstream of AAUAAA is required for rabbit β-globin m-RNA 3'-end formation. Nature 312, 473-474.

GILBERT, W. (1978): Why genes in pieces? Nature 271, 501.

GILBERT, W. (1985): Genes in pieces revisted. Science 228, 823-824.

GITSCHIER, J., WOOD, W.I., GORALKA, T.M., WION, K.L., CHEN, E.Y., EATON, D.H., VEHAR, G.A., CAPON, D.J. and LAWN, R.M. (1984): Characterization of the human factor VIII gene. Nature 312, 326-337.

GO, M. (1981): Correlation of DNA exonic regions with protein structure units in haemoglobin. Nature 291, 90-92.

GRANTHAM, R. (1980): Workings of the genetic code. Trends Biochem. Sci. 5, 327-331.

GRANTHAM, R., GAUTIER, C. and GOUY, M. (1980): Codon frequencies in 119 individual genes confirm consistent choices of degenerate bases according to genome type. Nucl. Acids Res. 8, 1893-1912.

GRANTHAM, R., GAUTIER, C., GOUY, M., JACOBZONE, M. and MERCIER, R. (1981): Codon catalog usage is a genome strategy modulated for gene expressivity. Nucl. Acids Res. 9, 443-474.

HAMADA, H., SEIDMAN, M., HOWARD, B.H. and GORMAN, C.M. (1984): Enhanced gene expression by the poly(dT-dG) • poly(dC-dA) sequence. Mol. and Cell. Biol. 4, 2622-2630.

HANAHAN, D. (1983): Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J. Mol. Biol. 166, 557-580.

HANAHAN, D. (1985): Techniques for transformation E. coli. In: DNA cloning (GLOVER, D.M. ed.), 1, 109-135. IRL Press, Oxford.

HANIFORD, D.B. and PULLEYBLANK, D.E. (1983): Facile transition of poly [d(TG) d(CA)] into a left-handed helix in physiological conditions. Nature 302, 632-634.

HARTL, P. (1983): Isolierung und Charakterisierung von c-myc und cκ-enthaltenden λ-Klonen aus Burkitt-Lymphomen mit 2,8 Translokationen. Diplomarbeit, Universität München.

HATTORI, M. and SAKAKI, Y. (1986): Dideoxy sequencing method using denatured plasmid templates. Anal. Biochem. 152, 232-238.

HEINRICH, P. (1986): Guidelines for quick and simple plasmid sequencing. Boehringer Mannheim GmbH, Biochemica, Mannheim.

HENTSCHEL, C., IRMINGER, J.-C., BUCHER, P. and BIRNSTIEL, M.L. (1985): Sea urchin histone mRNA termini are located in gene regions downstream from putative regulatory sequences. Nature 285, 147-151.

HENTSCHEL, C.C. and BIRNSTIEL, M.L. (1981): The organization and expression of histone gene families. Cell 25, 301-313.

HERRMANN, B.G. and FRISCHAUF, A.-M. (1987): Isolation of genomic DNA. Methods. Enzymol. 152, 180-183.

HIMMELWRIGHT, R.S., EICKMAN, N.C., LU BIEN, C.D., LERCH, K. and SOLOMON, E.I. (1980): Chemical and spectroscopic studies of the binuclear copper active site of Neurospora tyrosinase: Comparison to hemocyanins. J. Am. Chem. Soc. 102, 7339-7344.

HOHN, B. and HOHN, T. (1974): Activity of empty, headlike particles for packaging of DNA of the bacteriophage λ in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 2372-2376.

HOHN, B. and MURRAY, K. (1977): Packaging recombinant DNA molecules into bacteriophage particles in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3259-3263.

HOHN, B. (1979): In vitro packaging of λ and cosmid DNA. Methods Enzymol. 68, 299-309.

HOLMES, D.S. and QUICKLEY, M. (1981): A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114, 193-197.

HUBER, M., HINTERMANN, G. and LERCH, K. (1985): Primary structure of tyrosinase from Streptomyces glaucescens. Biochemistry 24, 6038-6044.

HUCKABY, C.S., CONNEELY, O.M., BEATTIE, W.G., DOBSON, A.D.W., TSAI,M.-J. and O'MALLEY, B.W. (1987): Structure of the chromosomal chicken progesterone receptor gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8380-8384.

IKEMURA, T. (1981): Correlation between the abundance of Escherichia coli transfer RNAs and the occurance of the repetitive codons in its protein genes. J. Mol. Biol. 146, 1-21.

IKEMURA, T. (1982): Correlation between the abundance of yeast transfer RNAs and the occurance of the respective codons in protein genes: Differences in synonymous codon choice patterns of yeast and Escherichia coli with reference to the abundance of the isoacceptor transfer RNAs. J. Mol. Biol. 158, 573-579.

IKEMURA, T. and OZEKI, H. (1982): Codon usage and transfer RNA contents: Organism-specific codon-choice patterns in reference to the isoacceptor contents. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 47, 1087-1096.

JACOBS, K., SHOEMAKER, C., RUDERSDORF, R., NEILL, S.D., KAUFMANN, R.J., MUFSON, A., SEEHRA, J., JONES, S.S., HEWICK, R., FRITSCH,E.F., KAWIKATA, M., SHIMIZU, T. and MIYAKE, T. (1985): Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. Nature 313, 806-810.

JAKUBKE, H.-D., JESCHKEIT, H., SCOTT, T. and BREWER, M. (1983): Concise encyclopedia of biochemistry. Walter de Gruyter Verlag, Berlin, New York.

JEFFREYS, A.J. and FLAVELL, R.A. (1977): The rabbit beta-globin gene contains a large insert in the coding sequence. Cell 12, 1097-1108.

JENSEN, E.O., PALUDAN, K., HYLDIG-NIELSEN, J.J., JØRGENSEN, P. and MARCKER, K.A. (1981): The structure of a chromosomal leghaemoglobin gene from soybean. Nature 291, 677-679.

JHIANG, S.M., GAREY, J.R. and RIGGS, A.F. (1988): Exon-Intron organization in genes of earthworm and vertebrate globins. Science 240, 334-336.

JONES, K.R., YAMAMOTO, K.R. and TIJAN, R. (1985): Two distinct transcription factors bind to the HSV thymidine kinase promotor in vitro. Cell 42, 559-572.

KARN, J., BRENNER, S. and BARNETT, L. (1983): New bacteriophage lambda vectors with positive selection for cloned inserts. Methods Enzymol. 101, 3-19.

KARN, J., BRENNER, S., BARNETT, L. and CESARINI, G. (1980): Novel bacteriophage λ cloning vector. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 5172-5176.

KARN, J., MATHES, H.W.D., GAIT, M.J. and BRENNER, S. (1984): A new selective phage cloning vector, λ 2001, with sites for Xba I, Bam HI, Hind III, Eco RI, Sst I and Xho I. Gene 32, 217-224.

KELLERMANN, J. (1982): Über das Vorkommen von Kohlenhydraten in der Kette e des Hämocyanins der Vogelspinne Eurypelma californicum. Diplomarbeit, Universität München.

KEMPTER, B. (1983): Site of hemocyanin biosynthesis in the tarantula Eurypelma californicum. Naturwissenschaften 70, 255-256.

KEMPTER, B. (1986): Intracellular hemocyanin and site of biosynthesis in the spider Eurypelma californicum. In: Invertebrate oxygen carriers (LINZEN, B. ED.), 489-494. Springer Verlag, Heidelberg.

KIM, S.M., MOORES, J.C., DAVID, D., RESPESS, J.G., JOLLY, D.J. and FRIEDMANN, T. (1986): The organizatioin of tue human HPRT gene. Nucl. Acids Res. 10, 3103-3118.

KIRBY, K.S. (1968): Isolation of nucleic acids with phenolic solvents. Methods Enzymol. 12B, 87-99.

KLEIN, B. and MURRAY, K. (1979): Phage lambda receptor chromosomes for DNA fragments made with restriction endonuclease I of Bacillus amyloliquefaciens H. J. Mol. Biol. 133, 289-294.

KOBAYASHI, I. STAHL, M. and STAHL, F. (1984): The mechanism of the chi-cos interaction in Rec A- Rec BC-mediated recombination in phage λ. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 49, 497-506.

KOZAK, M. (1983): Comparison of initiation of protein synthesis in procaryotes, eucaryotes and organelles. Microbiol. Rev. 47, 1-45.

LAMY, J., LECLERC, M., CINÈ, A., BONAVENTURA, J. and BONAVENTURA, C. (1983). Prliminary results on possible immunological relatedness between molluscan and arthropodan hemocyanins. In: Life Chem. Rep. (Suppl) 1, 143-146.

LANG, W.H. (1988): cDNA cloning of the Octopus dofleini hemocyanin. Sequence of the carboxyl-terminal domain. Biochemistry 27, 7276-7282.

LA THANGUE, N.B. and RIGBY, P.W.D. (1988): Trans-acting protein factors and the regulation of eukaryotic transcription. In: Transcription and splicing (HAMES, B.D. and GLOVER, D.M. eds.), 1-42. IRL Press, Oxford.

LEARY, J.J., BRIGATI, D.J. and WARD, C.C. (1983): Rapid and sensitive colorimetric method for visualizing biotin-labeled DNA probes hybrdized to DNA or RNA immobolized on nitrocellulose: Bio-blots. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4045-4049.

LEDER, P., TIEMEIER, D. and ENQUIST, L. (1977): EK2 derivatives of bacteriophage lambda useful in the cloning of DNA from higher organisms: The λgt WES system. Science 196, 175-177.

LEONARD, W.J., DEPPER, J.M., CRABTREE, G.R., RUCIKOFF, S., SVETLIK, P.B. PFEFFER, N.J., WALDMANN, T.A. and GREENE, W.C. (1984): Molecular cloning and expression of cDNAs for the human interleukin-2 receptor. Nature 311, 626-635.

LERCH, K. (1978): Amino acid sequence of the tyrosinase from Neurospora crassa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 3635-3639.

LERCH, K., HUBER, M., SCHNEIDER, H.-J., DREXEL, R. and LINZEN, B. (1986): Different origins of metal binding sites in binuclear copper proteins, tyrosinases and hemocyanin. J. of Inorganic Biochemistry 26, 213-217.

LIN, F.-K., SUGGS, S., LIN, C.-H., BROWNE, J.K., SMALLING, R., EGRIE, J.C., CHEN, K.K., FOX, G.M., MARTIN, F., STABINSKY, Z., BADRAWII, S.M., LAI, P.-H. and GOLDWASSER, E. (1985): Cloning and expression of the human erythropoietin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7580-7584.

LINZEN, B., SOETER, N.M., RIGGS, A.F., SCHNEIDER, H.-J., MOORE, M.D., YOKOTA, E., BEHRENS, P.Q., NAKASHIMA, H., TAKAGI, T., VEREIJKEN, J.M., BAK, H.J., BEINTEMA, J.J., VOLBEDA, A., GAYKEMA, W.P.J. and HOL, W.G.J. (1985): The structure of the arthropod hemocyanins. Science 229, 519-524.

LOENEN, W.A.M. and BLATTNER, F.R. (1983): Lambda cloning vectors (Ch 32, 33, 34 and 35) adapted for DNA cloning in recombination deficient hosts. Gene 26, 171-179.

LOEWE, R. and LINZEN, B. (1973): Hemocyanins in spiders, I. Subunits and stability region of Dugesiella californica hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354, 182-188.

MANDEL, M. and HIGA, A. (1970): Calcium dependent bacteriophage DNA infection. J. Mol. Biol. 53, 154-162.

MANIATIS, T., HARDISON, R.C., LACY. E., LAUER, J., O'CONNEL, C., QUON, D., SIM, G.K. and EFSTRATIATIS, A. (1978): The isolation of structural genes from libraries of eucaryotic DNA. Cell 15, 687-701.

MANIATIS, T., FRITSCH, E.F. and SAMBROOK, J. (1982): Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

MARKL, J., STRYCH, W., SCHARTAU, W., SCHNEIDER, H.-J., SCHÖBERL, P. and LINZEN, B. (1979): Comparison of the polypeptide chains of Eurypelma californicum hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 639-650.

MARKL, J., SAVEL, A. and LINZEN, B. (1981): Subunit composition of dissociation intermediates and its bearing on quaternary structure of Eurypelma hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 429-437.

MARKL, J. (1986): Evolution and function of structurally divers subunits in the respiratory protein hemocyanin from arthropods. Biol. Bull. 171, 90-115.

MASON, P.J. and WILLIAMS, J.G. (1985): Hybridisation in the analysis of recombinant DNA. In: Nucleic acid hybridisation . A practical approach (HAMES, B.D. and HIGGINS, S.J. eds.), 113-137. IRL Press, Oxford.

McDONNEL, M.W., SIMON, M.N. and STUDIER, F.W. (1977): Analysis of restriction fragments of T7 DNA and determination of molecular weights by electrophoresis in neutral and alkaline gels. J. Mol. Biol. 110, 119-146.

McKNIGHT, G.L. and KINGSBURY, R. (1982): Transcriptional control signals of a eucaryotic protein-coding gene. Science 217, 316-324.

McKNIGHT, G.L., O'HARA, P.J. and PARKER, M.L. (1986): Nucleotide sequence of the triosephosphate isomerase gene from Aspergillus nidulans: Implications for a differential loss of introns. Cell 46, 143-147.

McLAUCHLAN, J., GAFFNEY, D., WHITTON, J.L and CLEMENTS, J.B. (1985): The consensus sequence YGTGTTYY located downstream from the AATAAA signal is required for efficient formation of mRNA 3'termini. Nucl. Acids Res. 13, 1347-1368.

MERCER, J.F.B. and GRIMES, A. (1986): Isolation of a human ceruloplasmin cDNA that includes the N-terminal leader sequence. FEBS Lett. 203, 185-190.

MESSING, J.(1983): New M13 vectors for cloning. Methods Enzymol. 101, 20-78.

MESSING, J. and VIEIRA, J. (1982): A new pair of M13 vectors for selecting either DNA strand of double-digest restriction fragments. Gene 19, 269-276.

MOUNT, S.M. (1982): A catalogue of splice junction sequences. Nucl. Acids Res. 10, 459-472.

MORSE, M.P., MEYHÖFER, E., OTTO, J.J. and KUZIRAN, A.M. (1986): Hemoicyanin respiratory pigment in bivalve molluscs. Science 321, 1302-1304.

MÜLLER, G., RUPPERT, S., SCHMID, E. and SCHÜTZ, G. (1981): Functional analysis of alternative spliced tyrosinase gene transcripts. EMBO J. 7, 2723-2730.

MURRAY, N.E. and MURRAY, K. (1974): Manipulation of restriction targets in phage λ to form receptor chromosomes for DNA fragments. Nature 251, 476-481.

MUSTI, A.M., AVVEDIMENTO, E.V., POLISTINA, C., URSINI, V.M., OBICI, S., NITSCH, L., COCZZA, S. and DiLAURO, R. (1986): The complete structure of the rat thyroglobulin gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 323-327.

MYERS, R.M., LERMAN, L.S. and MANIATIN, T. (1985): A general method for saturation mutagenesis of cloned DNA-fragments. Science 229, 242-247.

NEVINS, J.R. (1983): The pathway of eucaryotic mRNA formation. Ann. Rev. Biochem. 52, 441-466.

PADGETT, R.A., KONARSKA, M.M., GRABOWSKI, P.J., HARDY, S.F. and SHARP, P.A. (1984): Lariat RNAs as intermediates and products in the splicing of messenger RNA precursors. Science 225, 898-903.

PATTHY, L. (1985): Evolution of the proteases of the blood coagulation and fibrinolysis by assembly from modules. Cell 41, 657-663.

PROUDFOOT, N.J. and BROWNLEE, G.G. (1976): 3'non-coding region sequences in eucaryotic messenger RNA. Nature 263, 211-214.

PROUDFOOT, N.J. and WHITELAW, E. (1988): Termination and 3'end processing of eukaryotic RNA. In: Transcription and splicing (HAMES, B.D. and GLOVER, D.M. eds.), 97-129. IRL Press, Oxford.

PURVIS, I.J., BETTANY, A.J.E., SANTIAGO, T.C., COGGINS, J.R., DUNCAN, K., EASON, R. and BROWN. A.J.P. (1987): The efficiency of folding of some proteins is increased by controlled rates of translation in vivo. A hypothesis. J. Mol. Biol. 193, 413-417.

RIGBY, P.W.J., DIECKMANN, M., RHODES, C. and BERG, P. (1977): Labelling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113, 237-251.

RILEY, L.K., MORROW, J.K., DANTON, M.J. and COLEMAN, M.S. (1988): Human terminal deoxyribonucleotidyl-transferase: Molecular cloning and structural analysis of the gene and 5'flanking region. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2489-2493.

ROSENBERG, S.M., STAHL, M.M., KOBAYASHI, I. and STAHL, F.W. (1985): Improved in vitro packaging of coliphage lambda DNA. A one-strain system free from endogenous phage. Gene 38, 165-175.

RUPPERT, S., MÜLLER, G., KWON, B. and SCHÜTZ, G. (1988): Multiple transcripts of the mouse tyrosinase gene are generated by alternative splicing. EMBO J. 7, 2715-2722.

RUSKIN, B., KRAINER, A.R., MANIATIS, T. and GREEN, M.R. (1984): Excision of an intact intron as a novel lariat struture during pre-mRNA splicing in vitro. Cell 30, 317-331.

SANGER, F., NICKLEN, S. and COULSON, A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.

SCHARTAU, W., EYERLE, F., REISINGER, P., GEISERT, H., STORZ, H. and LINZEN, B. (1983): Complete amino acid sequence of subunit d from Eurypelma californicum hemocyanin, and comparison to chain e. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1383-1409.

SCHNEIDER, H.-J., MARKL, J., SCHARTAU, W. and LINZEN, B. (1977): Subunit heterogeneity of Eurypelma (Dugesiella) hemocyanin, and separation of polypeptid chains. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 1133-1141.

SCHNEIDER, H.-J., ILLIG, U., MÖLLER, E., LINZEN, B., LOTTSPEICH, F. and HENSCHEN, A. (1982): A presumptive active-site sequence of arthropodan hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 363,487-492.

SCHNEIDER, H.-J., DREXEL, R., FELDMAIER, G., LINZEN, B., LOTTSPEICH, F. and HENSCHEN, A. (1983): Complete amino-acid sequence of subunit e from Eurypelma californicum hemocyanin. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 1357-1381.

SERFLING, E. (1982): Struktur und Expression der Gene höherer Organismen. VEB Gustav Fischer Verlag Jena.

SMINIA, T. (1977): Hemocyanin-producing cells in gastropod molluscs. In: Structure and function of hemocyanins (BANNISTER, J. ed.), 279-288. Springer Verlag Heidelberg.

SOUTHERN, E. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments seperated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517.

STERNBERG, N., TIEMEIER, D. and ENQUIST, L. (1977): In vitro packaging of a λ Dam vector containing Eco RI DNA fragments of Escherichia coli and phage P1. Gene 1, 255-280.

STONE, E.M., ROTHBLUM, K.N., ALEVY, M.C., KUO, T.M. and SCHWARTZ, R.J. (1985): Complete sequence of the chicken glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 1628-1632.

SÖDHOF, T.C., GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S. and RUSSEL, D.W. (1985): The LDL receptor gene: A mosaic of exons shared with different proteins. Science 228, 815-822.

SZOSTAK, J.W., STILES, J.I., TYE, B.-K., CHIU, P., SHERMAN, F. and WU, R. (1979): Hybridization with synthetic oligonucleotides. Methods Enzymol. 68, 419-429.

TABOR, S, and RICHARDSON, C.C. (1987): DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 4767-4771.

TORZCYNSKI, R.M., FUKE, M. and BOLLON, A.P. (1984): Human genomic library screened with 17-base oligonucleotide probes yields a novel interferon gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 6451-6455.

TRAUT, T.W. (1988): Do exons code for structural or functional units in proteins? Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2944- 2948.

VOIT, R. (1984): Hämocyanin-mRNA aus der Vogelspinne Eurypelma californicum: Translation in vitro und reverse Transkription. Diplomarbeit, Universität München.

VOIT, R. and SCHNEIDER, H.-J. (1986): Tarantula hemocyanin mRNA. In vitro translation, cDNA cloning and nucleotide sequence corresponding to subunit e. Eur. J. Biochem. 159, 23-29.

VOIT, R. (1987): Klonierung und Charakterisierung von cDNA für das Hämocyanin der Vogelspinne Eurypelma californicum. Doktorarbeit , Universität München.

VOLBEDA, A. (1988): The 3,2 Å resolution X-ray structure of Panulirus interruptus hemocyanin. Proefschrift, Rijksuniversiteit Groningen.

WALLACE, R.B., JOHNSON, M.J., SUGGS, S.Y., MYOSHI, K., BHATT, R. and ITAKURA, K. (1981): A set of synthetic primers for DNA sequencing in the plasmid pBR322. Gene 16, 21-26.

WASYLIK, B., CORDEN, J., BRISON, O. and CHAMBON, P. (1980a): Specific in vitro initiation of transcription on conalbumin and ovalbumin genes and comparison with adenivirus-2 early and late genes. Nature 285, 367-373.

WASYLIK, B., DERBYSHIRE, R., GUY, A., MOLKO, D., ROGET, A., TEOULE, R., and CHAMBON, P. (1980b): Specific in vitro transcription of conalbumin gene is drastically decreased by single-point mutation in T-A-T-A box homology sequence. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 7024-7028.

WILLIAMS, B.G. and BLATTNER, F.R. (1979): Construction and characterization of the hybrid bacteriophage lambda charon vectors for DNA cloning. J. Virol. 29, 555-575.

WOODS, D. (1984): Oligonucleotide screening of cDNA libraries. BRL FOCUS 6, No. 3, 1-3.

WYMAN, A.R. and WERTMAN, K.F. (1987): Host strain that alleviate underrepresentation of specific sequences: Overview. Methods Enzymol. 152, 173-180.

YANISH-PERRON, C., VIEIRA, J. and MESSING, J. (1985): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: Nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33, 103-119.

YARBROUGH, P.O., HAYDEN, M.A., DUNN, L.A., VERMERSCH, P.S., KLASS, M.R. and HECHT, R.M. (1987): The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family in the nematode, Caenorhabditis elegans: isolation and characterization of one of the genes. Biochim. et Biophys. Acta 908, 21-33.

LEBENSLAUF

Name:	Wolfgang Martin Michael Voll
Geburtstag und -ort:	20. August 1956, München
Eltern:	Friedrich Voll und Hildegard Voll, geb. Volkmann
1962-1966	Besuch der Volksschule am Bayernplatz in München
1966-1975	Besuch des Oskar von Miller Gymnasiums in München
1975	Abitur
1975-1976	Wehrdienst
ab 1977	Studium der Biologie an der Universität München
Herbst 1982	Diplomprüfung Hauptfach: Zoologie Nebenfächer: System. Botanik und allg. Geologie
1983-1984	Diplomarbeit am Zoologischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen mit dem Thema: "Untersuchungen zur Primärstruktur tryptischer Peptide der Kette β des Hämocyanins aus dem Flußkrebs Astacus leptodactylus".
Mai 1984	Beginn der vorliegenden Promotionsarbeit am Zoologischen Institut der Universität München unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Bernt Linzen mit dem Thema: "Klonierung und Charakterisierung eines Hämocyanin-Gens der Vogelspinne Eurypelma californicum".
Mai 1984-Mai 1987	Graduierten-Stipendium des Bayerischen Staates
ab Mai 1987	wissenschaftlicher Mitarbeiter